

TRANSFER-RIBONUCLEINSÄUREN AUS BACILLUS SUBTILIS

**Biosynthese, Modifikationen und Eigenschaften
spezifischer Transfer-Ribonucleinsäuren**

von

Randolph Raettig

aus

Bremen

1976 № 1 65



Digitized by the Internet Archive
in 2026

TRANSFER-RIBONUCLEINSÄUREN AUS BACILLUS SUBTILIS

**Biosynthese, Modifikationen und Eigenschaften
spezifischer Transfer-Ribonucleinsäuren**

Den Naturwissenschaftlichen Fachbereichen
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades



vorgelegt

von

Randolph Raettig

aus

Bremen



Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaftlichen
Fachbereichen der Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung: 20.2.1976

Vorsitzender der Promotionskommission:	Professor Dr. H. Remmert
Erstberichterstatte:	Professor Dr. H. Kersten
Zweitberichterstatte:	Professor Dr. E. Schweizer

Meinen lieben Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde bei Frau Prof. Dr. H. Kersten
- Arbeitsgruppe Biochemie -
Fachbereich Chemie/Biologie
an der Universität Erlangen - Nürnberg durchgeführt

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	9
2.1.	Material	9
2.2.	Bakterienstämme und Zuchtbedingungen	12
2.3.	Präparation von Gesamt-tRNA	14
2.4.	Reinheitsprüfungen der tRNA-Präparationen	15
2.5.	Präparation von Enzymextrakten	17
2.6.	Aminoacylierung von tRNA	19
2.7.	Methylierung von tRNA	20
2.8.	Chromatographie von tRNA	21
2.9.	Komponentenanalysen von tRNA	23
2.10.	Kaliumpermanganatbehandlung von tRNA	24
2.11.	Schmelzkurven	24
3.	ERGEBNISSE	26
3.1.	Enzymatische Aminoacylierung von tRNAs aus <i>Bacillus subtilis</i>	26
3.2.	Das Elutionsverhalten von tRNAs aus <i>B. subtilis</i> in der "Reversed-Phase" Chromatographie	32
3.3.	Biosynthese spezifischer tRNAs in Abhängigkeit von den physiologischen Bedingungen des Zellwachstums	39
3.3.1.	tRNA-Isoacceptoren unter dem Einfluß von Pactamycin	40
3.3.2.	Änderung der Elutionsprofile spezifischer tRNAs unter dem Einfluß unterschiedlicher Belüftungsbedingungen	52
3.4.	Nachträgliche Methylierung von tRNA aus behandeltem <i>B. subtilis</i>	58

3.5.	Biosynthese von tRNA ^{Phe}	68
3.6.	Biosynthese von tRNA ^{Tyr}	81
3.7.	Reaktivität von Phenylalanin- und Tyrosin-spezifischen tRNAs gegenüber KMnO ₄	91
3.8.	Isolierung spezifischer tRNAs aus B.subtilis	95
3.9.	Zusammensetzung von tRNA ^{Tyr} _{II}	103
3.10.	Charakterisierung spezifischer tRNAs durch ihr Schmelzverhalten	104
4.	DISKUSSION	111
5.	ZUSAMMENFASSUNG	126

Literaturverzeichnis

Anhang

Abkürzungen

A ₂₆₀	1 A ₂₆₀ ist diejenige Substanzmenge, die, gelöst in 1 ml, bei 260 nm und d = 1 cm die Extinktion 1 ergibt.
Ac	Acetat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BD-Cellulose	Benzoylierte Diäthylaminoäthylcellulose
CM	Chloramphenicol
CM-tRNA	tRNA, die aus mit Chloramphenicol behandelten Bakterien isoliert wurde
DEAE-Cellulose	Diäthylaminoäthylcellulose
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
PA	Pactamycin
PA-tRNA	tRNA, die aus mit Pactamycin behandelten Keimen isoliert wurde
PPO	2,5-Diphenyloxazol
Dimethyl-POPOP	1,4-bis-2-(4-Methyl-5-phenyloxazolyl)-benzol
Pu	Purin
Py	Pyrimidin
RPC	Reversed-Phase Chromatographie
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
Upm	Umdrehungen pro Minute

1. Einleitung und Fragestellung

Ribonucleinsäuren (RNAs) sind essentielle Komponenten zentraler Stoffwechselvorgänge. Die messenger RNA (mRNA) enthält in Form von Nucleotidtripletts die Information der Aminosäuresequenzen von Proteinen. Ribosomale RNAs (rRNAs) sind integraler Bestandteil von funktionsfähigen Ribosomen, an denen die Proteinsynthese stattfindet. Transfer RNAs (tRNAs) übertragen die Aminosäuren während der Proteinsynthese. Durch Wechselwirkung ihres Anticodons mit den Tripletts der mRNA bewirken sie die korrekte Übersetzung der Nucleotidsequenz der mRNA in die Aminosäuresequenz der Proteine. Transfer RNAs sind weiterhin an der Biosynthese der Zellwand sowie an Regulationsvorgängen beteiligt.

Die Biosynthese von Ribonucleinsäuren (mRNA, rRNA, tRNA) umfaßt mehrere Einzelschritte. Durch die enzymatische Verknüpfung von Nucleosidtriphosphaten an der DNA entsteht das primäre Transkriptionsprodukt. Es ist meistens größer als das funktionelle, "reife" Molekül. Die Reaktionen, die vom primären Transkriptionsprodukt zum reifen Molekül führen - zusammenfassend als Reifungsprozeß bezeichnet -, beinhalten enzymatische Spaltungen und spezifische Modifizierungen von Nucleotiden. Die Spaltung der Polynucleotidkette führt zu Molekülen, deren Größe der der reifen RNA entspricht. Modifizierungen von Nucleotiden finden vor und nach den Spaltungen statt.

Die Modifikation von Ribonucleinsäuren hat besonders Beachtung gefunden, weil von ihr ein Einblick in die Bedeutung der Struktur für die Funktion erwartet wurde.

In allen Arten von Ribonucleinsäuren - mRNA, rRNA und tRNA - wurden inzwischen modifizierte Nucleotide gefunden. In tRNA und rRNA bestehen die Modifizierungen zu einem großen Anteil, in mRNA ausschließlich aus Methylierungen. Die Methylierungen finden sowohl am Basenkörper als auch am 2'-Ribose-Sauerstoffatom statt.

Die Methylierung der mRNA wurde erst in jüngster Zeit gefunden.

Zumindest eine Funktion der Methylierung von mRNA liegt in ihrem Einfluß auf die Translatierbarkeit des messengers. Es liegen sogar Hinweise dafür vor, daß ohne Methylierung keine Translation der mRNA stattfinden kann (Both et al., 1975).

Länger bekannt ist, daß auch ribosomale RNAs methylierte Nucleotide enthalten. Dies konnte sowohl für 16S und 23S rRNA aus Procaryoten (Fellner, 1969) als auch für ribosomale RNAs aus Eucaryoten gezeigt werden. Die Sequenzanalyse der 16S rRNA aus *E. coli* machte deutlich, daß die methylierten Nucleotide in einigen Bereichen des Polynucleotids gehäuft auftreten ("Cluster": Ehresmann et al., 1975). Die Bedeutung der methylierten Nucleotide für die Funktion der ribosomalen RNAs ist noch nicht geklärt. Die kleinste ribosomale RNA, die 5S rRNA, enthält keine Modifizierungen.

Am intensivsten untersucht sind die Modifizierungen der tRNAs. tRNAs enthalten wesentlich mehr modifizierte Nucleotide als die anderen RNA-Arten. In dieser Klasse von etwa 60 strukturell sehr ähnlichen Molekülen wurde vermutet, daß die Modifizierungen verantwortlich sind für die Vielzahl der verschiedenen Funktionen, die tRNAs ausüben. tRNAs sind Substrat für mehr als zehn verschiedene, durch Proteine katalysierte Reaktionen, von denen jede einen spezifischen Erkennungsprozeß erfordert. Hierzu gehören einige der Reaktionen, die vom primären Transkriptionsprodukt zum reifen Molekül führen, die spezifische Aminoacylierung, die Formylierung der procaryotischen Initiations-tRNAs, Bildung des Initiationskomplexes, Wechselwirkung mit dem Elongationsfaktor Tu, Beteiligung am Peptidyl-Transfer, Komplexierung mit Proteinen zur Ausbildung von Repressoren der Aminosäuresynthese, Beteiligung an der Zellwandsynthese, Primer für die Replikation von Tumor-Viren.

Die häufigste Modifizierung von tRNAs besteht in der Methylierung von Basen oder der Ribose, es wurde jedoch auch eine Vielzahl anderer Modifikationen gefunden, von denen die Umwandlung von Uridin in Dihydrouridin (D oder DhU) oder in Pseudouridin (Ψ) die häufigsten sind.

Gemäß der Häufigkeit ihres Auftretens und ihrer Position innerhalb der Nucleotidkette lassen sich die tRNA-Modifikationen folgendermaßen einteilen (Abb. 1):

- i) Modifizierungen, die in fast allen tRNAs vorkommen und immer an derselben Position auftreten. Als Beispiele seien Ribothymidin (T) und Pseudouridin (Ψ) in Schleife 4 sowie Dihydrouridin in Schleife 1 genannt; diese Modifizierungen haben den Schleifen ihren Namen gegeben (TΨC-Schleife; DhU-Schleife);
- ii) Modifizierungen, die seltener vorkommen, jedoch immer dieselbe Position einnehmen. In diese Klasse gehören z. B.
4-Thiouridin (s^4U) an Position 8 vom 5'-Ende,
7-Methylguanosin (m^7G) in Schleife 3,
1-Methyladenosin (m^1A) an Position 19 vom 3'-Ende.

Als Spezialfall dieser Klasse können die

- ia) hypermodifizierten Nucleotide neben dem 3'-Ende des Anticodons bezeichnet werden. Beispiele sind N^6 -Isopentenyladenosin (i^6A) und 2-Methylthio- N^6 -isopentenyladenosin (ms^2i^6A). tRNAs, die dieselbe hypermodifizierte Base neben dem Anticodon tragen, sind durch ein gemeinsames Nucleotid im Codon für die entsprechende Aminosäure korreliert.

Ein weiterer Spezialfall wird von den

- iib) modifizierten, häufig mehrfach modifizierten Nucleotiden in der ersten Position des Anticodons gebildet. In dieser Position werden oft Ribosemethylierungen gefunden.

Dieses gehäufte Auftreten einzelner Modifikationen an bestimmten Positionen in der tRNA läßt eine funktionelle Bedeutung vermuten. Bisher konnte jedoch in nur sehr wenigen Fällen die Bedeutung der Modifikation für die Funktion ermittelt werden.

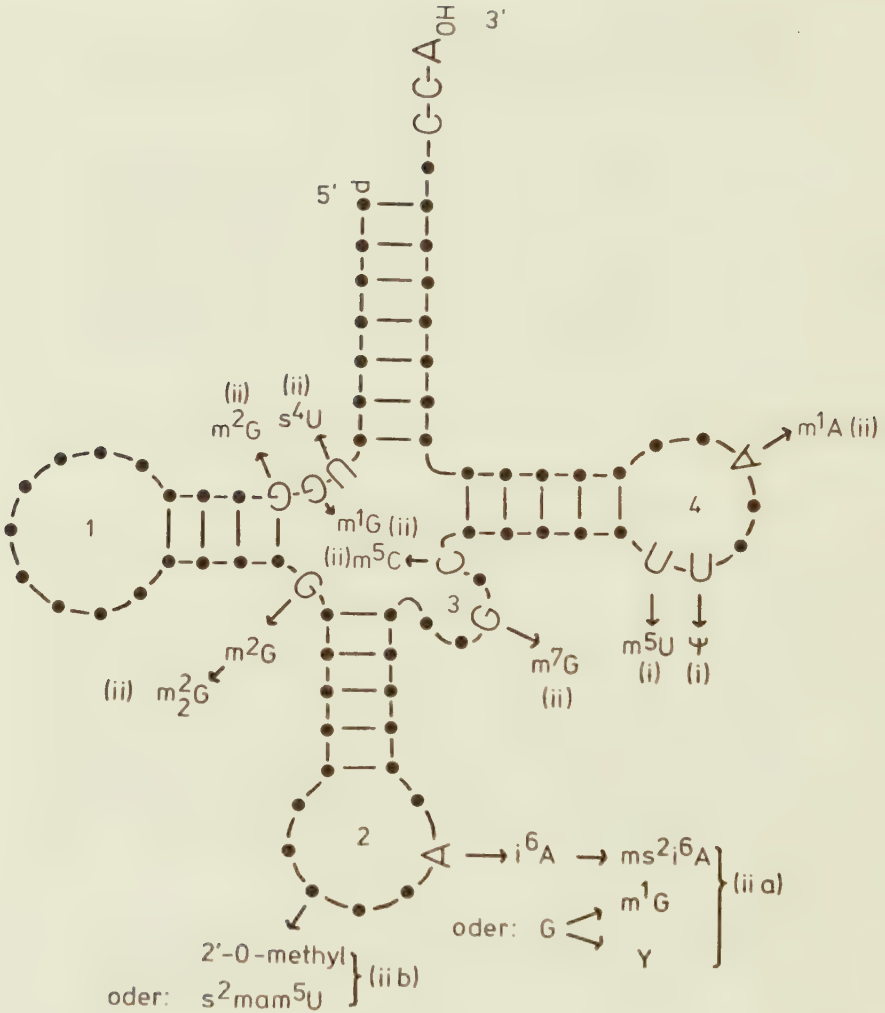


Abb. 1: Positionen der häufig vorkommenden Modifizierungen der tRNA. Die in Klammern gesetzten Angaben beziehen sich auf die im Text vorgenommene Klassifizierung. Die Zahlen in den Schleifen entsprechen der üblichen Numerierung entgegen dem Uhrzeigersinn.

Die Methylierung von Guanosin an Position 10 vom 5'-Ende zu 2-Methylguanosin (m^2G) beeinflusst die Erkennung zahlreicher tRNAs durch Phenylalanyl-tRNA Synthetase aus Hefe (Roe et al., 1973a, 1973b). Die besten Substrate für dieses Enzym sind - neben der homologen $tRNA^{Phe}$, die an Position 10 ein m^2G enthält - heterologe tRNAs, die durch in vitro Methylierung dieser Position dem homologen Substrat "ähnlich" gemacht wurden.

Die Y-Base, ein hypermodifiziertes G-Derivat neben dem Anticodon von $tRNA^{Phe}$ (Hefe), hat keinen Einfluß auf die Wechselwirkung von $tRNA^{Phe}$ mit Phenylalanyl-tRNA Synthetase (Thiede und Zachau, 1968). Die Codon-abhängige Ribosomenbindung ist jedoch nach Eliminierung dieser Base vermindert (Ghosh und Ghosh, 1970), wahrscheinlich aus stereochemischen Gründen.

Von der Sequenz GT Ψ CPu, die in fast allen tRNAs in Schleife 4 vorkommt, wird vermutet, daß sie während der Proteinsynthese mit der 5S rRNA Wechselwirkungen eingeht, da 5S rRNAs die komplementäre Sequenz UGAAC aufweisen (Forget und Weissman, 1967; Richter et al., 1973). Diese Wechselwirkung scheint durch die Modifikationen T und Ψ erleichtert, da - in Gegenwart von 50S Ribosomenuntereinheiten - das Oligonucleotid T Ψ CG mit einer dreifach höheren Assoziationskonstanten an 5S rRNA gebunden wird als das unmodifizierte Oligonucleotid UUCG (Erdmann et al., 1973).

Arbeiten von Singer et al. (1972) zeigen eindeutig die Funktion von zwei Pseudouridinresten in der Nähe des Anticodons von $tRNA^{His}$ aus *Salmonella typhimurium* auf. Fehlen diese Modifikationen, so ist $tRNA^{His}$ nicht in der Lage, als Corepressor des Histidin-Operons zu fungieren. Die Funktion dieser tRNA in der Aminoacylierung (Brenner et al., 1972) und in der in vivo Protein-synthese (Chang et al., 1971) scheint von dieser Modifikation unbeeinflusst zu sein.

Die Schwierigkeiten in der Suche nach der Funktion der Modifizierungen in der tRNA liegen meist darin, daß keine spezifisch untermodifizierten Vergleichs-tRNAs dargestellt werden können.

Zwei Wege wurden beschritten, um untermodifizierte tRNAs zu erhalten. Der erste Weg führt über Mutanten, die untermodifizierte tRNAs enthalten. Schon seit 1962 steht eine für Methionin auxotrophe E.coli-Mutante zur Verfügung, die bei Methioninmangel methylgruppendifiziente tRNA accumuliert (Fleissner und Borek, 1962). Hierbei sind alle Methylierungen unspezifisch und gleich stark betroffen.

Spezifisch untermethylierte tRNAs wurden durch Isolierung von Mutanten erhalten, denen ein modifizierendes Enzym fehlt. So ist eine E.coli-Mutante bekannt, die keine m⁵U-Methyltransferase enthält (Björk und Isaksson, 1970). Andere E.coli-Mutanten enthalten kein 7-Methylguanosin (Marinus et al., 1975). Aus Hefe sind zwei Mutanten bekannt, deren tRNA kein N²-Dimethylguanosin enthält (Phillips und Kjellin-Straby, 1967). Der Weg, über Mutanten mit fehlenden Methyltransferasen untermethylierte tRNAs zu isolieren, ist insofern eine vielversprechende Methode, weil hiermit s p e z i f i s c h untermodifizierte tRNAs erhalten werden. Die Schwierigkeiten liegen jedoch darin, daß das Auffinden der Mutanten mit untermodifizierter tRNA erheblichen experimentellen Aufwand erfordert.

Ein zweiter Weg besteht in der Behandlung von wachsenden Zellen mit Proteinsynthesehemmstoffen, die die strenge Kontrolle zwischen Protein- und RNA-Synthese aufheben. Von unter diesen Bedingungen synthetisierter tRNA konnte gezeigt werden, daß sie sowohl im Hinblick auf Methylierungen (Kersten et al., 1968) als auch im Hinblick auf andere Modifikationen wie 4-Thiouridin oder Dihydrouridin (Waters, 1969; Waters et al., 1973) untermodifiziert sind. Diesen Systemen gemeinsam ist, daß nicht spezifisch eine Modifizierung, sondern immer mehrere Modifizierungen betroffen sind.

Eine spezifisch m⁵U-defiziente tRNA konnte durch Behandlung von B. subtilis mit Trimethoprim erhalten werden. Dieses Antibiotikum hemmt das Enzym Dihydrofolatreduktase und entzieht damit der Zelle das in B. subtilis für die Methylierung von U zu m⁵U notwendige Coenzym, ein Tetrahydrofolsäure-Derivat (Kersten et al., 1975).

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, zu untersuchen, unter welchen Bedingungen in *Bacillus subtilis* spezifische untermodifizierte tRNAs entstehen.

Zunächst waren Bedingungen zu erarbeiten, die die Veresterung von Aminosäuren mit den für sie spezifischen tRNAs aus *B. subtilis* durch homologe Aminoacyl-tRNA Synthetasen erlauben. Das Verteilungsmuster der für 18 Aminosäuren spezifischen tRNAs aus *B. subtilis* mußte durch chromatographische Analyse an RPC-5 - Säulen erstellt werden. Weiterhin sollte die Methode der Analyse der Verteilung von tRNA-Isoacceptoren so verfeinert werden, daß geringe Mengen biologischen Materials zur Analyse ausreichten.

Veränderte Bedingungen während des Wachstums wurden durch Gaben von Hemmstoffen der Proteinsynthese, durch Variation der Sauerstoffversorgung oder durch Variation der Zusammensetzung des Nährmediums erreicht. Die Folgen der veränderten Wachstumsbedingungen auf das Verteilungsmuster spezifischer tRNAs waren zu analysieren. Hierbei stellte sich im besonderen die Frage, ob tRNA-Isoacceptoren, die nach Gabe von Hemmstoffen der Proteinsynthese auftreten, untermodifiziert sind.

Da in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen zwei Tyrosin-spezifische tRNAs in etwa gleichen Mengen auftreten, wurde zunächst eine tRNA^{Tyr} aus *Bacillus subtilis* isoliert und zusammen mit zwei weiteren tRNAs aus *B. subtilis* - tRNA^{Met}_f und tRNA^{Phe} in ihrem Schmelzverhalten und durch Basenanalyse charakterisiert.

Die Kenntnis der Bedingungen, unter denen untermodifizierte tRNAs vorkommen, kann dazu beitragen, den Biosyntheseweg von tRNAs aufzuhellen. Die Untersuchungen dienen darüberhinaus einer Isolierung spezifischer untermodifizierter tRNAs. Diese werden benötigt als Substrate zur Reinigung spezifischer tRNA-Methyltransferasen und zum Studium der Wechselwirkungen zwischen diesen Enzymen und ihren Substraten.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Alle gängigen Chemikalien wurden im "pro-analyse"-Reinheitsgrad von E. Merck, Darmstadt, bezogen. Von derselben Firma erhielten wir 2-[4-(2-Hydroxyäthyl)-piperazinyl-(1)]-äthansulfonsäure (HEPES), 2-Morpholinoäthansulfonsäure (MES) und N,N-Bis(2-hydroxyäthyl)-glycin (Bicin). Dimethylarsinsäure-Natriumsalz (Natriumcacodylat) war ein Produkt von Merck-Schuchardt. ATP wurde von Boehringer, Mannheim, geliefert.

Die für die Chromatographien benötigten Chemikalien kamen von folgenden Firmen:

BD-Cellulose: Boehringer, Mannheim;

Sephadex (alle Typen) und DEAE-Sephadex A-50: Pharmacia, Uppsala, Schweden;

Résines Voltalef 300 LD-PL micro: Ugine Kuhlmann, Frankreich, über Lehmann & Voss, Hamburg;

Adogen 464: Ashland Chemical Co., Columbus, Ohio, USA, über W. Biesterfeld & Co., Hamburg;

Ultrogel AcA 34: LKB, Bromma, Schweden;

Cellulose Dünnschichtplatten ohne Fluoreszenzindikator: Merck, Darmstadt;

DEAE-Cellulose DE 32: Whatman, England, über Serva Entwicklungslabor, Heidelberg.

Transfer RNA aus E. coli MRE 600 und aus Hefe kamen von Boehringer, Mannheim.

2.1.2. Antibiotika

Pactamycin war ein Geschenk der Upjohn Company, Kalamazoo, Michigan, USA. Chloramphenicol wurde als Paraxin (Boehringer) eingesetzt. Rifampicin wurde uns von CIBA-Geigy, Basel, Schweiz, überlassen.

2.1.3. Radioaktive Substanzen

Die radioaktiven Substanzen wurden ausschließlich von The Radiochemical Centre, Amersham, bezogen. Sie wurden in folgenden spezifischen Aktivitäten geliefert:

Isotop Substanz	³ H Ci/mmol	¹⁴ C mCi/mmol
Ala	34	173
Arg	16	336
Asp	0,178	-
Aspn	--	100
Cys	--	25
Glu	3,6	125
Gln	--	49
Gly	2,8	50
His	55	150
Ile	12	150
Leu	52	348
Lys	--	312
Met	--	56
Phe	20	522
Pro	0,653	-
Ser	5,3	75
Thr	--	100
Trp	--	54
Tyr	49	225 483
Val	17,7	125
SAM ^{a)}	--	55

a) SAM = S-Adenosyl-methionin

Die spezifischen Aktivitäten der radioaktiven Aminosäuren wurden mit 0,1 M oder 1 mM Lösungen nicht markierter Aminosäuren verdünnt. ¹⁴C-SAM wurde mit einer Lösung von 3,73 mg/ml ¹²C-SAM in 10⁻³N H₂SO₄ verdünnt.

2.1.4. Chromatographiezubehör

Die Säulenchromatographien wurden in Glassäulen mit angeschmolzenem Kühlmantel der Firma Labor-Center, Erlangen, durchgeführt. Temperaturkonstanz wurde mittels Colora-Thermostaten erreicht.

Die Verwendung von Perpex-Pumpen (LKB Produkter AB, Bromma, Schweden) ermöglichte konstante Durchflußraten. Das Eluat wurde zur Ermittlung der UV-Absorption durch ein Uvicord I oder II (Messung bei 254 nm) oder durch ein Uvicord III (simultane Messung bei 254 und bei 280 nm), alles Produkte derselben Firma, geleitet. Die Meßsignale wurden auf Zweikanalschreibern (LKB) oder auf Sechskanalschreibern (Colora, Lorch) registriert. Die Leitfähigkeit des Eluates wurde mit einem Conductolyzer (LKB) gemessen. Die Fraktionen wurden in einem Ultrorac-Fraktions-sammler (LKB) gesammelt, der in einer Colora-Kühltruhe aufgestellt war.

2.1.5. UV-Spektralphotometer

Die optische Dichte einzelner Fraktionen sowie die Konzentration von Nucleinsäurelösungen wurden in Zeiss-Photometern, Typ PMQ II oder PMQ III, bestimmt.

Kontinuierliche Spektren wurden routinemäßig an einem Beckman-Gerät, Modell 25, aufgenommen. Genauere Spektren wurden mit einem Gilford 2400-Photometer erhalten.

2.1.6. Szintillatoren und Szintillationszähler

Die Radioaktivität wurde in Tricarb-Flüssigkeitsszintillationszählern der Firma Packard (Modelle 3320 und 3385) bestimmt. Die Szintillatoren PPO und Dimethyl-POPOP wurden von W. Zinsser, Frankfurt, geliefert.

Die Szintillatorlösungen hatten folgende Zusammensetzung:

Toluolszintillator: 5 g PPO + 0,3 g Dimethyl-POPOP in
 1 l Toluol

Dioxanszintillator:	Naphthalin	60	g
	Äthylenglykol	20	ml
	Methanol	100	ml
	PPO	4	g
	Dimethyl-POPOP	0,2	g
	Dioxan	ad 1000	ml

2.2. Bakterienstämme und Zuchtbedingungen

2.2.1. Bacillus Subtilis W 23

Zwei verschiedene Medien wurden für die Züchtung von Bacillus subtilis W 23 verwendet:

Glucose-Salz-Medium: (Nakada, 1965)	KH_2PO_4	6,0	g/l
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	11,5	g/l
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,2	g/l
	$(\text{NH}_4)\text{SO}_4$	2,0	g/l
	Na-Glutaminat	2,54	g/l
	Glucose	4,0	g/l
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,33	mg/l
TYG-Medium (Doi, 1971)	Bacto-Trypton (Difco)	25	g/l
	Yeast Extract (Difco)	20	g/l
	KH_2PO_4	3	g/l
	Glucose	30	g/l

Kleine Kulturen (bis maximal 1 l Medium) erhielten ein 1 % oder 2 % Inoculum einer Übernachtskultur. Sie wurden in einem New Brunswick Gyrotary Shaker bei 37°C geschüttelt. Die Schüttelgeschwindigkeit wurde zwischen den Schalterstellungen 5 ($\hat{=}$ 180 Upm) und 12 ($\hat{=}$ 250 Upm) variiert. Das Wachstum wurde durch Messung der optischen Dichte bei 578 nm verfolgt. Zur Ernte wurden die Kulturen in Eiswasser abgekühlt, durch Zentrifugation sedimentiert und bei - 20°C eingefroren.

Größere Bakterienmengen wurden in einem Fermenter mit 20 l Fassungsvermögen der Firma Eschweiler, Kiel, gezüchtet. Bei Züchtung in Nakada-Medium wurde nach Erreichen der stationären Phase ($A_{578} = 1,8 - 2,0$) durch Zentrifugation mit einer Ceba-

Durchlaufzentrifuge geerntet. Bei Züchtungen in TYG-Medium muß in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet werden, da sich aus Keimen der stationären Phase keine biologisch aktive tRNA extrahieren läßt. (Arnold, persönliche Mitteilung).

Weiterhin wurde *B. subtilis* W 23, gezüchtet in Nakada-Medium, von E. Merck, Darmstadt, bezogen.

2.2.2. *Bacillus subtilis* met⁻ind⁻rel⁺

Bacillus subtilis met⁻ ind⁻ rel⁺ wurde in Nakada-Medium unter Zusatz von Methionin (12,5 mg/l) und Indol (25 mg/l) gezüchtet. Methioninmangelbedingungen wurden durch Zusatz von lediglich 3 mg/l Methionin erreicht.

2.2.3. *Escherichia coli* MRE 600

Zur Gewinnung von Extrakten mit hoher SAM-abhängiger Methyltransferase-Aktivität wurde *E. coli* MRE 600 in Maximalmedium der Zusammensetzung

Fleischextrakt	5 g/l
Pepton	5 g/l
NaCl	5 g/l

gezüchtet und in der logarithmischen Wachstumsphase ($A_{578} = 0,7$) geerntet. Die Keime wurden anschließend sofort bei - 20°C eingefroren.

2.2.4. Behandlung der Zellkulturen mit Antibiotika

Für eine Reihe von Fragestellungen wurden die wachsenden Kulturen mit verschiedenen Antibiotika behandelt. *Bacillus subtilis* W 23 wurde mit 0,25 mg/l Pactamycin behandelt, nachdem die Kultur eine $A_{578} = 0,7$ erreicht hatte. Nach weiteren drei Stunden wurden die Zellen geerntet. Rifampicin (50 mg/l) wurde zu verschiedenen Zeiten des Wachstums zugesetzt. Die Ernte geschah 20 oder 30 min später (vgl. 3.5.3.).

Für die Behandlung von *B. subtilis* met⁻ ind⁻ rel⁺ mit Chloramphenicol wurden dem Medium von Anfang an 2 mg/l des Antibiotikums zugesetzt. Die Hauptkultur wurde nach 12 Stunden geerntet.

2.2.5. "in vivo" Methylgruppenmarkierung der tRNA

Sechs ml einer Übernachtskultur von *B. subtilis* W 23 wurden auf 200 ml Nakada-Medium überimpft, das 100 μ Ci ¹⁴C(CH₃)-Methionin $\hat{=}$ 7 μ mol enthielt. Die Bakterien wurden nach Erreichen der stationären Phase geerntet.

2.3. Präparation von Gesamt-tRNA

Es hat sich im Verlaufe dieser Arbeit als notwendig erwiesen, den Präparationsweg für Gesamt-tRNA nach der in Frage kommenden Bakterienart und der vorhandenen Ausgangsmenge auszuwählen. Ziel war jeweils, auf raschem Wege eine biologisch aktive tRNA-Präparation zu erhalten, die weitgehend frei sein sollte von niedermolekularen und hochmolekularen Verunreinigungen.

2.3.1. Präparation von Gesamt-tRNA aus kleinen Mengen (0,1 - 2 g) *Bacillus subtilis*

Die Bakterien werden in 1 - 2 ml Aufschlußpuffer (Doi, 1971) suspendiert, mit demselben Volumen 80 % Phenol / 20 % Puffer versetzt und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach zehnmütigem Zentrifugieren bei 15.000 x g wird die wäßrige Phase abgehoben und die Phenolphase mit 1/2 Volumen desselben Puffers extrahiert. Nach abermaliger Zentrifugation unter denselben Bedingungen werden die wäßrigen Phasen vereinigt und auf eine 1 x 3 cm DEAE-Cellulose-Säule (Whatman DE 32) gegeben, die zuvor mit Puffer A äquilibriert war. Restprotein sowie niedermolekulare Bestandteile und Phenol werden mit 50 ml Puffer A ausgewaschen, die Gesamt-tRNA wird anschließend mit Puffer B eluiert. Beträgt die tRNA-Konzentration des Eluats mehr als 4 A₂₆₀/ml, kann die Gesamt-tRNA direkt durch Zusatz des doppelten Volumens Äthanol/2 % KAc gefällt werden. Nach mehrstündigem Stehen bei -20°C wird der Niederschlag durch Zentrifugation

Puffer A:	0,25 M NaCl	Puffer B:	wie Puffer A,
	0,01 M MgAc_2		jedoch 0,5 M NaCl
	1 mM EDTA		
pH	4,8		

gesammelt und im Wasserstrahlvakuum über KOH-Plättchen getrocknet. Die tRNA wird in trockenem Zustand im Kühlschrank aufbewahrt. Bei Konzentrationen unter $4 \text{ A}_{260}/\text{ml}$ wird das Säulenuat zweimal dialysiert und anschließend am Rotationsverdampfer auf ein geringes Volumen eingengt. Diese Lösung kann direkt für Analysen und biologische Tests verwendet oder zur Aufbewahrung eingefroren werden.

2.3.2. Präparation von Gesamt-tRNA aus großen Mengen (10 - 100 g) *Bacillus subtilis*

Für die Präparation größerer Mengen an Gesamt-tRNA erwies sich die unter 2.3.1. beschriebene Methode als ungünstig, da sie einen im Großmaßstab zeitraubenden säulenchromatographischen Schritt beinhaltet. Zudem ließ sich durch Chromatographie an DEAE-Cellulose nicht immer die DNA entfernen. Es wurde deshalb eine Methode verwendet, die sich aus einzelnen Schritten verschiedener, in der Literatur beschriebener Präparationswege zusammensetzt.

Die einzelnen Schritte können wie folgt zusammengefaßt werden:

- Extraktion der Nukleinsäuren durch Phenolbehandlung der Zellen (Doi, 1971, vgl. 2.3.1.);
- Fällung der Nukleinsäuren durch Äthanol, dadurch Abtrennung der niedermolekularen Bestandteile;
- Abtrennung der ribosomalen RNA durch fraktionierte Fällung mit 2 M LiCl (Avital und Elson, 1969);
- Abtrennung der DNA durch fraktionierte Fällung mit i-Propanol in 0,3 M NaAc bei pH 7,0 (Zubay, 1962).

2.4. Reinheitsprüfung der tRNA-Präparationen

Vier Kriterien wurden für die Reinheit einer tRNA-Präparation herangezogen. Sie ermöglichten die Erkennung von Proteinverun-

reinigungen (Messung der UV-Absorption bei 260 und 280 nm), niedermolekularen Nukleinsäureverunreinigungen (Elektrophorese in 10 % Polyacrylamidgelen), hochmolekularen Verunreinigungen (Gelpermeationschromatographie an Sephadex G-200) sowie die Messung der biologischen Aktivität im Acceptoraktivitätstest gegenüber Phenylalanin.

2.4.1. UV-Absorption bei 235, 260 und 280 nm

Die Quotienten A_{260}/A_{235} und A_{260}/A_{280} liegen bei reinen tRNA-Präparationen bei $2,0 \pm 0,1$, wobei der Quotient A_{260}/A_{235} meist etwas niedriger ist. Erheblich niedrigere Werte deuten auf Verunreinigung durch Protein hin; diese Präparationen müssen abermals mit Phenol extrahiert werden.

2.4.2. Elektrophorese von tRNA in 10 % Polyacrylamidgelen

Die Elektrophorese in 10 % Polyacrylamidgelen ermöglichte es, Verunreinigungen durch tRNA-Bruchstücke und 5S rRNA zu erfassen. Die Elektrophorese wurde in Zylindergelen diskontinuierlich durchgeführt, wobei die Laufstrecke im Trenngel 5,5 cm betrug. Genaue Angaben zur Durchführung sind bei Arnold (1973) beschrieben.

DNA und hochmolekulare ribosomale RNA werden bei dieser Methode qualitativ dann erfaßt, wenn das Sammelgel ebenfalls angefärbt wird. DNA ist erkenntlich an der violetten Färbung, die jedoch nach längerem Entfärben stark abnimmt.

2.4.3. Gelpermeationschromatographie von tRNA an Sephadex G-200

Chromatographie an Sephadex G-200 ermöglicht es, hoch- und niedermolekulare Verunreinigungen quantitativ zu erfassen. Hochmolekulare Nucleinsäuren werden mit dem Ausschlußvolumen der Säule eluiert, während niedermolekulare Substanzen erst nach der tRNA im Eluat erscheinen (Abb. 2). Zur Analyse werden 5 - 15 A_{260} der Probe in einem Volumen von 0,1 - 0,3 ml auf eine 1 x 100 cm Säule gegeben, die mit 0,2 M NaCl, 0,01 M $MgAc_2$,

0,01 M Tris-HCl, pH 7,5, äquilibriert und eluiert wurde. Die Chromatographie wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Durchflußrate betrug 10 ml/h. Abb. 2 verdeutlicht gleichzeitig die Effizienz der in der Präparation von Gesamt-tRNA angewendeten Fraktionierung mit iso-Propanol.

2.4.4. Acceptoraktivitätstest für Phenylalanin

Der Test wurde wie in 2.6.1. beschrieben durchgeführt. Als ausreichend wurden Werte angesehen, die über 30 pmol Phe/A₂₆₀ lagen.

2.5. Präparation von Enzymextrakten

Enzymextrakte aus *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli* wurden als Quelle für Methyltransferasen und Aminoacyl-tRNA Synthetasen benötigt.

2.5.1. Präparation eines S-30-Extrakts

10 g Bakterien (Feuchtgewicht) werden mit 30 g Alcoa im Mörser aufgeschlossen und in 20 ml Tris-Puffer nach Nirenberg und Matthaei (1961) aufgenommen (0,01 M Tris-HCl, pH 7,8; 6 mM 2-Mercaptoäthanol; 6 mM KCl; 0,01 M MgAc₂). Alcoa und Zelltrümmer werden niedertourig abzentrifugiert, der Überstand wird eine Stunde im 8 x 50 ml - Rotor in der MSE 18 Zentrifuge (Measuring and Scientific Equipment, London, England) bei 16.000 Upm = 30.000 x g zentrifugiert. Die oberen 3/4 des Überstandes werden in kleinen Portionen eingefroren.

2.5.2. Präparation eines S-100-Überstands

Aufschluß der Bakterien, Aufnahme des Zellsaftes und niedertourige Zentrifugation erfolgen wie für die Präparation des S-30 - Extrakts beschrieben. Der Überstand der ersten Zentrifugation wird 2 h im 10 x 10 ml - Rotor in der MSE 65 Ultrazentrifuge bei 43.000 Upm = 100.000 x g zentrifugiert. Die oberen zwei Drittel des Überstandes werden in kleinen Portionen bei -70°C eingefroren.

Der Proteingehalt wurde mit der Mikrobioret-Methode (Bailey,

Abb. 2: Chromatographie an Sephadex G-200 von

A: DNA (Säuleneichung)

B: tRNA (Säuleneichung)

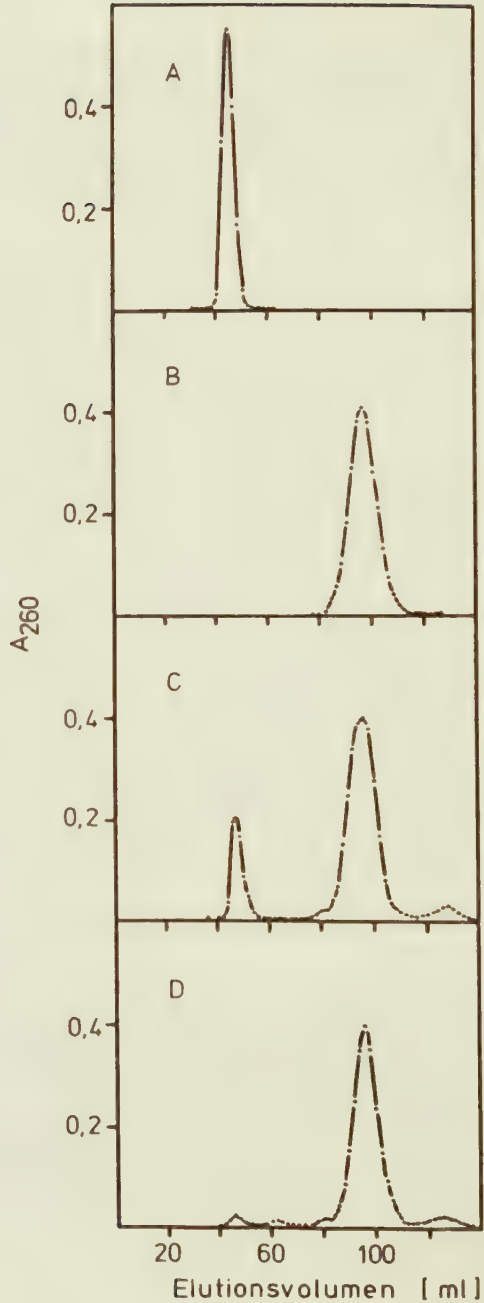
C: tRNA-Präparation vor der i-Propanol-Fraktionierung

D: tRNA-Präparation nach der i-Propanol-Fraktionierung

Die Chromatographien wurden an einer 1 x 100 cm

Säule in 0,2 M NaCl, 0,01 M MgAc₂, 0,01 M Tris-HCl,

pH 7,5, durchgeführt.



1967) bestimmt. Meist wurden Werte zwischen 8 und 15 mg/ml erhalten.

2.6. Aminoacylierung von tRNA

Die enzymatische Veresterung von Aminosäuren mit tRNA wurde in Ansätzen durchgeführt, deren Zusammensetzung im Ergebnisteil unter 3.1.2. angegeben ist.

2.6.1. Kinetik der Acylierungsreaktion

Die Messung der Kinetik der Aminoacylierungsreaktion wurde in 0,25 ml - Ansätzen nach der Methode von Mans und Novelli (1961) durchgeführt. Hierbei werden zu verschiedenen Zeitpunkten dem Ansatz je 50 μ l entnommen, auf Whatman 3MM Filter pipettiert und in 10 % Trichloressigsäure (TCA) gegeben. Nach mindestens zehnminütigem Stehen wird wie folgt gewaschen:

zweimal 5 %ige TCA,
einmal Äthanol/Äther (1 : 1),
einmal Äther.

Jeder Waschvorgang dauert 10 Minuten. Die Filter werden anschließend getrocknet, in Probengläschen mit 6 ml Toluolszintillator versetzt, und die Radioaktivität wird im Szintillationszähler gemessen.

2.6.2. Präparative Aminoacylierung

Für die präparative Aminoacylierung wurden die Mengen der niedermolekularen Bestandteile der Reaktionsansätze direkt proportional zum Volumen erhöht, so daß die Konzentrationen gleich blieben. Eine Erhöhung der tRNA-Konzentration konnte durch gleichzeitige Erhöhung der Enzymkonzentration kompensiert werden.

Präparative Aminoacylierungen, denen eine analytische Chromatographie an RPC-5 folgen sollte, wurden in 0,5 ml - Ansätzen 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Kochsalzkonzentration durch Zugabe von 0,2 ml 1 M NaCl auf 0,286 M NaCl gebracht. Dieses Gemisch wurde direkt auf die RPC-5-Säule aufgetragen. Die Anhebung der Kochsalzkonzentration erfolgt lediglich, um ein Abwaschen des Austauschers vom Trägermaterial durch das salzarme Milieu des Aminoacylierungsansatzes zu verhindern.

Für die Rückgewinnung der tRNA aus dem Acylierungsansatz wurden kleine DEAE-Cellulose-Säulen verwendet, die äquilibriert und eluiert wurden wie in 2.3.1. beschrieben.

2.7. Methylierung von tRNA

Die enzymatische Übertragung der Methylgruppen des S-Adenosylmethionins auf tRNA wurde nach dem Standardansatz von Hurwitz (1964) durchgeführt. Die tRNA-Menge pro Ansatz wurde variiert, da zu hohe tRNA-Konzentrationen zu Substrathemmung führen können (Kersten und Kersten, 1974).

Der Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

TMMG-Puffer	50	µl
(Triäthanolamin-HCl, pH 8,0:	100	mM;
2-Mercaptoäthanol:	20	mM;
Magnesiumchlorid:	10	mM.)
tRNA	0,2 - 2,0	A ₂₆₀
¹⁴ C-S-Adenosylmethionin	15 - 23	nmol
(spezifische Aktivität:		
3,33 und 17,9 mCi/mmol)		
S-100	100 - 400	µg
Tris-HCl, 0,05 M, pH 8,0	ad 160	µl

Die Inkubation erfolgt bei 37°C. Zu mehreren Zeitpunkten werden den Ansätzen 50 oder 20 µl entnommen, auf Whatman 3MM Papierfilter pipettiert, 20 sec im heißen Luftstrom getrocknet und in kalte 10 %ige Trichloressigsäure (TCA) gegeben. Nach mindestens halbstündigem Stehen wird wie folgt gewaschen:

- dreimal kalte 5 %ige TCA, je 5 min;
- zweimal Äthanol/Äther (1 : 1), je 5 min;
- einmal Äther, 5min.

Nach dem Trocknen wird die Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt.

Für präparative Methylierungen wurden alle Komponenten des Reaktionsansatzes linear erhöht. Die tRNA wurde aus dem Ansatz über DEAE-Cellulose-Säulen in der unter 2.3.1. beschriebenen Weise zurückgewonnen.

2.8. Chromatographie von tRNA

Zur Trennung von tRNA-Isoacceptoren wurde das von Kelmers und Mitarbeitern entwickelte RPC-5-System verwendet (Pearson et al., 1971). Die im Rahmen dieser Arbeit angewendeten Chromatographiebedingungen sind eine Weiterentwicklung der zunächst erstellten Methode (Raettig, 1973). Weiterhin wurden Auftrennungen an BD-Cellulose (Gillam et al., 1967) durchgeführt.

2.8.1. Analytische RPC-5-Chromatographien

Die Verteilung von tRNA-Isoacceptoren wurde an 1 x 50 cm Säulen analysiert. Das Füllen der Säule geschah in der von Pearson et al. (1971) beschriebenen Weise. Die Säule wurde mit Puffer C äquilibriert. Nach dem Auftragen der Probe wurde mit 30 ml Puffer C nachgewaschen, dann wurde das Chromatogramm mit einem linearen Gradienten von Puffer C nach Puffer D (0,4 M NaCl bis 1,0 M NaCl) entwickelt, das Gesamtvolumen des Gradienten betrug 500 ml.

Puffer C: 0,4 M NaCl; 0,01 M MgAc₂; 0,01 M NaAc, pH 4,5

Puffer D: 1,0 M NaCl, sonst wie Puffer C

Puffer E: 2,0 M NaCl, sonst wie Puffer C

Der Gradientenelution folgte ein Nachwaschen mit 30 ml Puffer E (2,0 M NaCl), bevor die Säule durch Äquilibration mit vier Säulenvolumen Puffer C für die nächste Chromatographie vorbereitet wurde. Die Durchflußrate betrug entweder 55 ml/h oder 85 ml/h mit geringen Schwankungen nach oben und unten, die Fraktionsgröße lag bei ca. 5,8 ml. Die Temperatur wurde mittels eines Thermostaten bei 25°C gehalten. Das Eluat durchlief nach dem Verlassen der Säule einen Radiochromatographen BF 5025 (Berthold Friesecke, Karlsruhe) sowie einen UV-Monitor (LKB Uvicord I oder Uvicord III), bevor es in einem gekühlten Fraktionssammler aufgefangen wurde.

Die hier beschriebenen Bedingungen wurden bei den meisten Chromatographien eingehalten und werden im folgenden als "Standardsäule" bezeichnet.

Geringe Variationen wurden im letzten Teil dieser Arbeit für die Chromatographie von Phenylalanin- und Tyrosin-spezifischen tRNA-Isoacceptoren eingeführt. Sie liegen im verkürzten Nachspülen mit Puffer C nach Auftrag der Probe (20 statt 30 ml) und in einer Reduktion des Gradientenvolumens auf 400 ml. Beide Änderungen hatten keinen Einfluß auf die Auflösung der in Frage kommenden tRNAs, verkürzten jedoch die Analysenzeiten um 70 min. Diese veränderten Bedingungen werden als "Standard-säule Phe/Tyr" bezeichnet.

Für die quantitative Auswertung wurden Fraktionen, die aus dem vom Radiochromatographen registrierten Elutionsprofil ausgewählt wurden, mit 4 ml 20 %iger TCA gefällt. Nach einstündigem Stehen im Eisbad wurden die Niederschläge auf Membranfiltern (Selectron, Typ BA 85, Schleicher & Schüll, Dassel) gesammelt. Die Filter wurden zweimal mit je 5 ml 5 %iger TCA und zweimal mit Wasser gewaschen und nach dem Trocknen und Zugabe von 5 ml Toluolszintillator gezählt.

2.8.2. Präparative Chromatographien an RPC-5

Für die Isolierung spezifischer tRNAs wurden Chromatographien an größeren RPC-5-Säulen durchgeführt. Die Säulen- und Elutionsparameter sind in der Legende zu Abbildung 30 bzw. 32 angegeben.

Für das Auffinden von spezifischen tRNAs im Eluat wurden Acceptoraktivitätstests durchgeführt. Ein Reaktionsansatz enthielt 0,1 ml aus der Fraktion, 0,05 ml Wasser und 0,1 ml Reaktionsgemisch mit allen anderen Bestandteilen entsprechend den in Abschnitt 3.1.2. angegebenen Konzentrationen.

Zur Wiedergewinnung der tRNA wurden die gewünschten Fraktionen vereinigt, am Rotationsverdampfer bis Salzsättigung eingeengt, erschöpfend dialysiert, abermals auf ein geringes Volumen eingeengt und mit dem zweifachen Volumen Äthanol/2 % KAc versetzt. Die tRNA wurde in gefälltem Zustand bei -20°C aufbewahrt.

2.8.3. Chromatographie an BD-Cellulose

Die Vorbereitung des Materials ist bereits beschrieben (Gillam

et al., 1971). Die Durchführung der Chromatographie geht aus der Legende zu Abb. 30 und 31 / Abschnitt 3.8.1. und 3.8.2. hervor. Das Auffinden spezifischer tRNAs im Eluat sowie die Wiedergewinnung der tRNA geschahen wie in 2.8.2. beschrieben.

2.9. Komponentenanalysen von tRNA

2.9.1. Basenanalysen

Basenanalysen wurden nach der Methode von Kahle et al. (1971), modifiziert nach Arnold (1973), durchgeführt. Hierbei werden tRNAs durch Perchlorsäure zu den Basen aufgespalten. Das entsalzte Hydrolysat wird zweidimensional an Cellulose-Dünnschichtplatten aufgetrennt.

2.9.2. Bestimmung von 4-Thiouridin

4-Thiouridin (s^4U) zeichnet sich durch ein Absorptionsmaximum bei 335 nm aus (Lipsett, 1965). Bei dieser Wellenlänge absorbieren die Hauptbasen der tRNA nicht. Durch Messung der Absorption einer Probe bei 335 nm und bei 260 nm kann der Gehalt an s^4U bestimmt werden.

Die Absorption der zu bestimmenden tRNA-Probe wird zunächst bei 260 nm in einer Küvette mit 2 mm Schichtdicke bestimmt. Die Absorption soll zwischen 1 und 2 liegen (entsprechend einer A_{260} von 5 - 10 für $d = 1$ cm). Dieselbe Lösung wird mit einer trockenen Pipette in eine Küvette mit $d = 1$ cm überführt und die Absorption bei 335 nm gemessen. Über folgenden Rechengang wird der Gehalt an s^4U berechnet:

Extinktionskoeffizienten:

$$s^4U : 1,5 \cdot 10^4 \text{ l} \cdot \text{Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \quad (\text{Hall, 1971})$$

$$tRNA : 1 A_{260} \hat{=} 44 \mu\text{g/ml} \hat{=} 1,8 \text{ nMol/ml} = 1,8 \mu\text{Mol/l}$$

$$\epsilon = \frac{E}{c \cdot d} = \frac{1}{1,8 \cdot 10^{-6} \text{ Mol} \cdot 1 \text{ cm}} = 5,55 \cdot 10^5 \text{ l} \cdot \text{Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

Index 1: s^4U

Index 2: tRNA

$$c_1 = \frac{E_{335}}{\epsilon_1 \cdot d_1}$$

$$c_2 = \frac{E_{260}}{\epsilon_2 \cdot d_2}$$

$$\frac{c_1}{c_2} = \frac{E_{335} \cdot \epsilon_2 \cdot d_2}{\epsilon_1 \cdot d_1 \cdot E_{260}} = \frac{E_{335} \cdot 5,55 \cdot 10^5 \cdot 0,2}{E_{260} \cdot 1,5 \cdot 10^4 \cdot 1} = \frac{E_{335}}{E_{260}} \cdot 7,4$$

Das Resultat hat die Dimension Mol/Mol. Mit der Annahme, daß die mittlere Kettenlänge einer tRNA bei 80 Nucleotiden liegt, erhält man durch Multiplikation mit dem Faktor 100/80 eine Aussage in mol%. Der Mittelwert zahlreicher Bestimmungen an *B. subtilis* tRNA liegt bei 0,19 mol%; d. h. auf etwa 530 Nucleotide entfällt ein s^4U . Dieser Wert liegt geringfügig über dem von Goehler und Doi (1968) für *B. subtilis* tRNA angegebenen.

2.10. Kaliumpermanganatbehandlung von tRNA

Transfer RNA wurde mit $KMnO_4$ nach der von Kline, Fittler und Hall (1969) angegebenen Methode mit Modifizierungen nach Juarez et al. (1975) umgesetzt. 20 A_{260} tRNA, gelöst in 0,4 ml H_2O , werden mit 0,25 ml 0,01 %iger Kaliumpermanganatlösung 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssiges $KMnO_4$, erkenntlich an der leichten Rosa-Färbung der Lösung, wird durch Zugabe von 10 μ l einer Natriumsulfitlösung (2 mg/ml) zerstört. Anschließend wird sofort mit 2 ml Äthanol/2 % KAc gefällt. Nach mehrstündigem Stehen bei $-20^\circ C$ wird der Niederschlag abzentrifugiert, nach dem Trocknen in 1 ml 0,001 M Tris-HCl, pH 7,5, gelöst und über Nacht gegen 1 l desselben Puffers dialysiert. Es wird abermals gefällt, der Niederschlag wird mit Äthanol gewaschen, getrocknet und in 1 ml H_2O gelöst.

Eine Kontrolle, die durch alle Schritte, jedoch ohne $KMnO_4$ -Zugabe, mitgeführt wurde, zeigte nach dieser Behandlung keine Veränderung in ihren tRNA-Isoacceptoren.

2.11. Schmelzkurven

Die Abhängigkeit der UV-Absorption der tRNAs von der Temperatur

wurde in einem Gilford Thermoprogrammer 2527 in Verbindung mit einem Gilford Spektralphotometer 2400 gemessen. In Anlehnung an Yang, Söll und Crothers (1972) wurden folgende Puffersysteme für die Messung verwendet:

		{	0,39 mM NaH ₂ PO ₄	pH = 7,0
			0,61 mM Na ₂ HPO ₄	
PCES			10 mM Na-cacodylat	
[Na ⁺]	= 0,117 M		1 mM Na ₂ EDTA	
			50 mM Na ₂ SO ₄	
PCES + Mg ²⁺		{	dieselben Komponenten + 0,01 M MgSO ₄	
[Na ⁺]	= 0,117 M			
[Mg ²⁺]	= 0,01 M			

Die tRNA-Proben (1 ml) wurden vor der Messung dreimal gegen je 200 ml des entsprechenden Puffers dialysiert. Die entgasten Lösungen wurden dann mit einer Spritze in die Küvetten überführt. Vor Beginn des Aufheizens wurde der gesamte Küvettenblock 30 min bei der Ausgangstemperatur äquilibriert. Die Aufheizrate betrug 0,5°C/min. UV-Absorption der Proben sowie die Temperatur wurden automatisch vom Schreiber registriert.

3. Ergebnisse

3.1. Enzymatische Aminoacylierung von tRNAs aus *B. subtilis*

Vorbedingung für eine Reihe von Untersuchungen, die in dieser Arbeit beschrieben werden, war die Schaffung von Reaktionsbedingungen, die eine enzymatische Veresterung von Aminosäuren mit den für sie spezifischen tRNAs erlauben. Für die Aminoacyl-tRNA Synthetasen und tRNAs aus *E. coli* sind zahlreiche Ansätze beschrieben, unter denen diese Reaktion weitgehend quantitativ abläuft. Im Gegensatz dazu ist die enzymatische Aminoacylierung von tRNAs aus *B. subtilis* nur für wenige Fälle untersucht worden, so daß eine Versuchsserie notwendig wurde, um auch in diesem Fall zufriedenstellende Aminoacylierungen zu erhalten. Dabei war es das Ziel, eine möglichst quantitative Umsetzung von tRNA zu Aminoacyl-tRNA zu erreichen.

Im Verlaufe dieser Untersuchung wurde eine Arbeit zugänglich, die für die aus *B. subtilis* 168 trp C2 isolierten Komponenten eine Aminoacylierung beschreibt (Vold und Minatogawa, 1972). Die dort angegebenen Bedingungen sind nicht in allen Fällen mit den hier erarbeiteten identisch.

3.1.1. Auswahl der Bedingungen

Wegen der Vielzahl der Parameter, die Geschwindigkeit und Ausmaß der Aminoacylierungsreaktion beeinflussen, konnte nicht in jedem Fall eine Optimierung durch systematische Variation aller einzelnen Parameter vorgenommen werden. Es wurden vielmehr als Ausgangspunkt Reaktionsbedingungen gewählt, die für die entsprechende Reaktion mit Komponenten aus *E. coli* in der Literatur beschrieben sind. Jedoch wurde Wert darauf gelegt, zwitterionische Puffersubstanzen nach Good (1966) einzusetzen, da sie in vielen Fällen eine höhere Beladung der tRNA ermöglichen als herkömmliche Puffer wie z. B. Tris (Rubin et al., 1967). Die mit diesen Ansätzen erhaltenen Ergebnisse wurden dann als befriedigend angesehen, wenn sie den in der Literatur angegebenen gleich waren.

Einige Aminosäuren (Ala, Glu, Gly, Ser, Thr, Trp) wurden durch die Aminoacyl-tRNA Synthetasen eines S-100-Extrakts nur sehr schlecht, jedoch mit linearer Kinetik über 15 min auf tRNA übertragen. Diese Beobachtungen lassen sich wie folgt deuten:

- i) die verschiedenen Aminoacyl-tRNA Synthetasen sind in dem verwendeten S-100-Extrakt in sehr unterschiedlichen Konzentrationen vorhanden,
o d e r
- ii) einige Aminoacyl-tRNA Synthetasen werden während der Präparation des S-100-Extrakts erheblich schneller als andere inaktiviert.

Zur Überprüfung der zweiten Möglichkeit wurden die Aminoacylierungsreaktionen für die sechs angegebenen Aminosäuren mit einem S-30-Extrakt anstelle eines S-100-Extrakts als Quelle der Aminoacyl-tRNA Synthetasen durchgeführt. In allen sechs Fällen konnte hiermit eine Beladung der tRNA erreicht werden, die Literaturwerten entspricht.

Weder Glutamin noch Cystein konnten unter diesen Bedingungen auf tRNA übertragen werden. Auf eine weitere Suche nach Acylierungsbedingungen der für diese Aminosäuren spezifischen tRNAs wurde verzichtet.

3.1.2. Zusammensetzung der Aminoacylierungsgemische

In Tabelle 1 sind die für die Aminoacylierung von tRNAs aus *B. subtilis* durch homologe Aminoacyl-tRNA Synthetasen erprobten Reaktionsgemische zusammengestellt. Im einzelnen wurden folgende Literaturhinweise herangezogen:

Leu: Rubin, Kelmers und Goldstein, 1967

Ala, Glu, Gly, Ser, Thr: Vold und Minatogawa, 1972

Arg, Met, Phe, Val: Weeren, Ryon, Heatherly und
Kelmers, 1970

Asp, Aspn, His, Ile, Pro: Söll und RajBhandary, 1967

Trp: Buckingham, Danchin und Grunberg-Manago, 1973

Die tRNA-Menge betrug meistens zwischen 0,5 und 1 A₂₆₀ im An-

satzvolumen von 0,25 ml, jedoch wird auch die doppelte Menge tRNA in 30 min in demselben Ausmaß umgesetzt. Der Reaktionsansatz für die Acylierung von Phenylalanin-spezifischen tRNAs enthält als Puffersubstanz Glycin anstelle eines zwitterionischen Puffers, da Glycin gleich gute Ergebnisse wie HEPES liefert, jedoch billiger ist.

In den Ansätzen, die bei pH 7,2 und bei pH 7,5 durchgeführt werden, kann HEPES ohne Nachteil durch Natriumcacodylat ersetzt werden.

2-Mercaptoäthanol wird häufig zum Schutz von SH-Gruppen den Ansätzen beigegeben. In dieser Arbeit wurde meist auf den Zusatz dieser Verbindung verzichtet, da ihr Einfluß auf die Beladbarkeit von tRNA sehr gering ist (vgl. Rubin et al., 1967).

Die Ansätze für die Aminoacylierung von tRNA^{Glu} und tRNA^{Thr} enthalten neben Magnesiumacetat auch Magnesiumchlorid (Vold und Minatogawa, 1972). Es ist nicht zu erkennen, warum die Magnesiumionen in Form von zwei verschiedenen Salzen zugefügt werden, zumal Chloridionen durch die Zugabe von KCl ausreichend im Ansatz vorhanden sind. Untersuchungen über die Notwendigkeit der Zugabe von Magnesium c h l o r i d wurden nicht durchgeführt.

Einwertige Kationen sind für die Aminoacylierung unbedingt notwendig (Rubin et al., 1967). In den meisten Ansätzen wurde Kalium als Kation gewählt. Für die Aminoacylierung von tRNA^{Leu} haben Ammoniumionen leichte Vorteile gegenüber Kaliumionen (Rubin et al., 1967), daher wurde in diesem Ansatz NH₄Cl anstelle von KCl eingesetzt.

Wegen des hohen Anteils an ribosomalen Proteinen wurde in den S-30-Präparationen auf eine Proteinbestimmung verzichtet. Werden die S-30-Extrakte streng nach der unter 2.5.1. angegebenen Methode hergestellt, so wird mit verschiedenen Extrakten dasselbe Ausmaß an aminoacylierter tRNA erhalten.

3.1.3. Acceptoraktivitäten von tRNA aus *B. subtilis*

Drei verschiedene Substrate wurden in ihrer Acceptoraktivität für 18 Aminosäuren untersucht:

Tab. 1: Bedingungen für die Aminoacylierung von tRNAs aus *Bacillus subtilis* durch homologe Aminoacyl-tRNA Synthetasen. Alle Reaktionen wurden in 0,25 ml Ansätzen durchgeführt. Die Substratmenge lag in allen Fällen zwischen 0,5 und 1 A₂₆₀.

	Ala	Arg	Asp	Aspn	Glu	Gly	His	Ile	Leu
Typ	BICIN ^{a)}	HEPES ^{b)}	HEPES	HEPES	HEPES	BICIN	HEPES	HEPES	HEPES
Puffer									
pH	7,0	6,6	7,5	7,2	8,0	7,0	7,2	7,2	8,0
Konz. mM ^{c)}	50	100	100	100	100	50	100	100	100
MgAc ₂									
mM ^{c)}	10	10	10	10	10	10	10	10	20
MgCl ₂									
mM ^{c)}	5	10	10	10	10	5	10	10	
KCl									
mM ^{c)}									
NH ₄ Cl									
mM ^{c)}									
2-ME ^{e)}									
mM ^{c)}	1				5	1			5
ATP									
mM ^{c)}	2	4	2	1	2	2	2	2	4
radioakt. AS									
µM ^{c)}	14,6	12	11,2	16	12,8	16	13,2	13,2	11,5
Art	S-30	S-100	S-100	S-100	S-30	S-30	S-100	S-100	S-100
Enzym									
Menge d)	10 µl	200 µg	200 µg	200 µg	10 µl	10 µl	200 µg	200 µg	20 µg

- a) BICIN: N,N-Bis(2-hydroxyäthyl)-glycin
b) HEPES: 2-[4-(2-Hydroxyäthyl)piperazinyl-(1)]-äthansulfonsäure
c) Endkonzentrationen im Ansatz
d) Die angegebene Enzymmenge ist ausreichend, um in einem Ansatzvolumen von 0,25 ml 2 A₂₆₀ Gesamt-tRNA innerhalb von 30' zu acylieren.
e) 2-Mercaptoäthanol

Tab. 1: (Fortsetzung)

	Lys		Met		Phe		Pro		Ser		Thr		Trp		Tyr		Val	
	Typ	HEPES	HEPES	HEPES	Glycin	HEPES	HEPES	HEPES	HEPES	HEPES	HEPES	HEPES	HEPES	HEPES	HEPES	HEPES	HEPES	HEPES
Puffer	pH	7,8	7,8	7,8	8,4	7,5	7,5	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	7,4	7,4
	mM	100	100	100	100	100	100	100	50	100	100	100	100	100	100	100	100	100
MgAc ₂	mM	10	10	10	20	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
MgCl ₂	mM										10							
KCl	mM	10	10	10	20	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
NH ₄ Cl	mM																	
2-ME	mM										5		1					
ATP	mM	4	4	4	1	2	2	2	4				1	1	2	2	1	1
radioakt. AS	µM	16	70	70	22	60	60	10,7	10,7	16	16	37	37	37	8,9	8,9	12,8	12,8
Enzym	Art	S-100	S-100	S-100	S-100	S-100	S-100	S-30	S-30	S-30	S-30	S-30	S-30	S-30	S-100	S-100	S-100	S-100
	Menge	100 µg	100 µg	100 µg	20 µg	200 µg	200 µg	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	50 µg	50 µg	50 µg	50 µg

- i) tRNA aus *B. subtilis* W 23 (Kontrolle),
- ii) tRNA aus mit Pactamycin behandeltem *B. subtilis* W 23 (PA-tRNA),
- iii) tRNA aus *B. subtilis* met⁻ ind⁻ rel⁺, der im Methioninmangel unter Zusatz von Chloramphenicol gewachsen war (CM-tRNA).

Um Unterschiede im Reinheitsgrad der einzelnen Präparationen auszugleichen, werden die Ergebnisse (Tab. 2) auf die Acceptoraktivität für Phenylalanin als innerem Standard bezogen.

Tab. 2: Vergleich der Acceptoraktivitäten verschiedener tRNA-Präparationen aus *Bacillus subtilis*

Aminosäure	Kontroll-tRNA		PA-tRNA	CM-tRNA
	$\frac{\text{pmol Phe}}{\text{A}_{260}}$	$\frac{\text{pmol AS}}{\text{pmol Phe}}$	$\frac{\text{pmol AS}}{\text{pmol Phe}}$	$\frac{\text{pmol AS}}{\text{pmol Phe}}$
Alanin	22,0	0,48	- -	0,51
Arginin	58,2	1,29	0,97	1,66
Asparagin	61,7	1,35	1,22	1,23
Asparaginsäure	49,1	1,07	1,27	1,01
Glutaminsäure	28,0	0,61	- -	0,38
Glycin	39,7	0,87	- -	0,78
Histidin	25,0	0,55	0,48	0,26
Isoleucin	37,1	0,81	1,06	0,85
Leucin	100,9	2,21	1,66	2,78
Lysin	18,3	0,40	0,44	0,47
Methionin	77,6	1,70	1,19	1,67
Phenylalanin	45,6	1,00	1,00	1,00
Prolin	7,23	0,16	0,1	0,17
Serin	34,4	0,75	0,70	1,75
Threonin	37,0	0,81	- -	0,75
Tryptophan	21,6	0,47	1,06	0,33
Tyrosin	38,0	0,83	0,73	0,78
Valin	73,9	1,62	3,82	3,70

Neben einigen kleineren Schwankungen ist besonders auffallend, daß die Valin-Acceptoraktivität der tRNAs aus behandelten Keimen deutlich erhöht ist. Dies wirkt sich jedoch nicht auf das Elutionsprofil der tRNA^{Val}-Isoacceptoren aus (vgl. 3.3.1.1.). Eine weitere Untersuchung der Gründe, die zu der starken Erhöhung der Valin-Acceptoraktivität in tRNAs aus behandelten Keimen führen, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

3.2. Das Elutionsverhalten von tRNAs aus *B. subtilis* in der Reversed-Phase Chromatographie

Die Kenntnis der Elutionsprofile spezifischer tRNAs eines Organismus vermittelt eine Vielzahl von Informationen:

- i) An der Anzahl und relativen Elutionsposition von tRNA-Isoacceptoren können Vergleiche mit bekannten Profilen von tRNAs aus anderen Organismen angestellt werden. Hieraus werden interessante Aspekte für Evolutionsstudien auf molekularer Ebene erwartet (Cedergren et al., 1972; Beauchmin et al., 1973).
- ii) Änderungen der Elutionsprofile von tRNA-Isoacceptoren treten auf bei Differenzierung, Tumorbildung, nach Virusinfektion oder unter dem Einfluß von Antibiotika (vgl. 3.3.1.). Veränderungen im Elutionsverhalten einer tRNA-Species können verursacht werden durch unvollständige Biosynthese, Auftreten neuer modifizierender Enzyme, Bildung eines heterogenetisch determinierten Isoacceptors.
- iii) Für die Isolierung von reifen wie auch von untermodifizierten tRNAs ist es notwendig, die mit dem in Frage kommenden Isoacceptor überlappenden tRNAs zu kennen (vgl. 3.8.), um Verunreinigungen zu erfassen und Strategien für weitere Reinigungsschritte zu entwickeln.
- iv) Sie ermöglicht es, untermodifizierte tRNAs zu charakterisieren (vgl. 3.4.6).

Für die Ermittlung des Elutionsprofils spezifischer tRNAs aus *Bacillus subtilis* W 23 wurde die Reversed-Phase Chromatographie,

System 5 (RPC-5), nach Pearson et al. (1971) gewählt, da sie sich in Auflösungsvermögen und Analysenzeiten anderen Systemen wie BD-Cellulose oder MAK-Chromatographie überlegen zeigt. Zudem erlaubt das RPC-5-System die Verwendung kleiner Säulen und geringer Elutionsvolumina, so daß die Menge des zu analysierenden biologischen Materials erheblich herabgesetzt werden kann.

Üblicherweise wurden zwischen 2 und 8 A_{260} -Einheiten Gesamt-tRNA in einer Chromatographie analysiert. Um eine hohe Nachweisempfindlichkeit zu erreichen, wurden die tRNAs vor der Chromatographie mit einer radioaktiven Aminosäure verestert. Die Elutionsposition der tRNA-Isoacceptoren wurde durch Messung der säurefällbaren Radioaktivität in den Fraktionen bestimmt. Dieses Verfahren hat gegenüber dem umgekehrten Weg - der Aminoacylierung in den einzelnen Fraktionen - den Vorteil, daß das gesamte Eluat der Messung zugeführt werden kann. Zudem wirkt sich die starke Verdünnung der tRNA im Eluat nicht nachteilig aus, während die Aminoacylierung in den Fraktionen um so schwieriger wird, je stärker die Verdünnung ist.

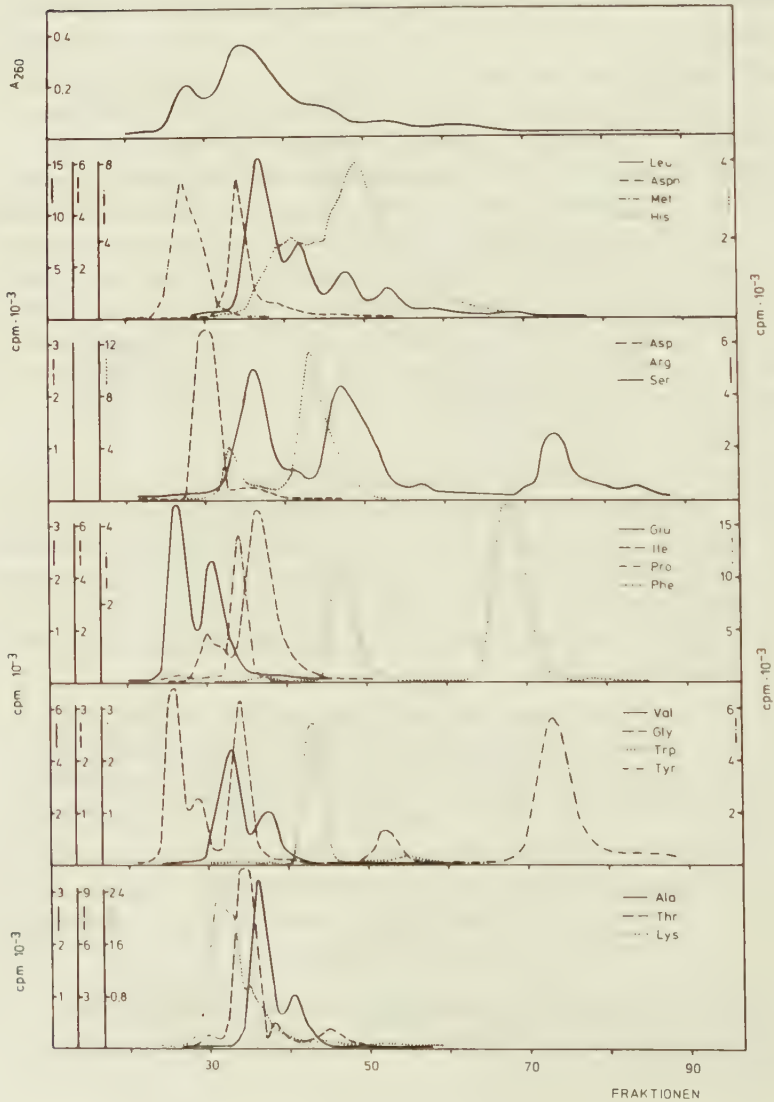
Ein Nachteil des eingeschlagenen Weges liegt darin, daß für jede Aminosäure eine separate Chromatographie durchgeführt werden muß. Dies erschwert die Zuordnung der Elutionsposition einzelner tRNA-Isoacceptoren zur Elutionsposition von für andere Aminosäuren spezifischen tRNAs. Um Unterschiede zwischen einzelnen Läufen auszugleichen, wurden die Radioaktivitätsgipfel wie folgt zugeordnet:

- i) Die gleichzeitige Registrierung der UV-Absorption erlaubte in den meisten Fällen die eindeutige Aussage, um welche Fraktionszahl vor oder nach optisch erfaßbaren Gipfeln die Radioaktivität eluiert wurde.
- ii) In strittigen Fällen (Asp, Aspn, Pro, Thr) gelang durch die gleichzeitige Chromatographie von mit einem anderen Isotop markierten Leucyl-tRNAs die eindeutige Zuordnung des Elutionsvolumens.

In Abb. 3 sind die Elutionsprofile der für 18 Aminosäuren spezifischen tRNAs zusammengestellt, die nun im einzelnen beschrieben werden sollen.

Abb. 3: RPC-5-Elutionsprofile von aminoacylierten tRNAs aus *B. subtilis*. Die Kurven geben die in den Fraktionen gemessene optische Dichte (oben) bzw. säurefällbare Radioaktivität an.

Chromatographiebedingungen: Standardsäule



Für A l a n i n wurden reproduzierbar zwei Isoacceptoren, Gipfelfraktion 36 bzw. 40/41, gefunden, abweichend von Literaturbefunden (Vold, 1973a), die von nur einer Alanin-spezifischen tRNA in *B. subtilis* berichten. Diese Diskrepanz mag darin begründet sein, daß zwei verschiedene Stämme untersucht wurden. In *E. coli* wurden - ebenfalls durch RPC-5-Analyse - zwei alanyl-tRNAs gefunden (Roe et al., 1973c).

A r g i n i n -spezifische tRNAs wurden - in Übereinstimmung mit Vold (1973a) - in zwei isoacceptierende Fraktionen aufgetrennt. In *E. coli* wurde zusätzlich, wenn auch in sehr geringem relativen Anteil, ein dritter Isoacceptor gefunden (Pearson et al., 1971).

Das Elutionsprofil der A s p a r a g i n y l -tRNAs zeigt neben dem Hauptgipfel (Gipfelfraktion: Fr. 34) an dessen hinterer Flanke einen weiteren, schlecht abgetrennten Isoacceptor (Fr. 39) sowie eine geringe Menge Radioaktivität in den Fraktionen 45 - 48. Ein ähnliches Bild wird von Vold (1973a) für tRNA aus log-Phase-Keimen angegeben.

Für A s p a r a g i n s ä u r e wurden zwei tRNA-Isoacceptoren gefunden, von denen der zuletzt eluierte einen sehr geringen relativen Anteil hat. In dem von Vold (1973a) angegebenen Elutionsprofil ist dieser Isoacceptor nicht zu erkennen.

Die für G l u t a m i n s ä u r e spezifischen tRNAs werden in zwei Isoacceptoren aufgetrennt, die in etwa gleich großen relativen Anteilen vorkommen. Von Vold (1973a) wurden ebenfalls zwei Glutaminsäure-spezifische tRNAs gefunden.

Die Acceptoraktivität für G l y c i n kann in Form von drei tRNA-Isoacceptoren eluiert werden. Zwischen zwei Hauptgipfeln liegt eine Glycyl-tRNA mit geringem relativen Anteil. Dieselbe Zahl von Isoacceptoren wird von Vold (1973a) angegeben, die relativen Anteile sind in der hier gezeigten Analyse zugunsten des ersten Gipfels verschoben. Doi et al. (1969) konnten an MAK-Säulen lediglich zwei tRNA^{Gly}-Isoacceptoren auffinden; ein für tRNA^{Gly} aus *E. coli* angegebenes Elutionsprofil

an RPC-5 (Roe et al., 1973c) zeigt sowohl in der Zahl (vier in *E. coli*) als auch in der relativen Verteilung der Isoacceptoren große Unterschiede zum hier für *B. subtilis* gezeigten.

H i s t i d i n -spezifische tRNAs lassen sich - in Übereinstimmung mit Vold (1973a) - in Form von zwei unvollständig voneinander getrennten Isoacceptoren eluieren.

Das Elutionsprofil von I s o l e u c y l -tRNAs zeigt zwei Isoacceptoren. Vold (1973a) sowie Doi et al. (1969) berichten von einem dritten Isoacceptor, der später als die beiden hier gefundenen spezifischen tRNAs eluiert wird. In keiner der vom Verfasser durchgeführten Chromatographien war ein dritter Radioaktivitätsgipfel aufzufinden. Das RPC-5-Elutionsprofil von tRNA^{Ile} aus *E. coli* (Roe et al., 1973c) gleicht dem hier angeführten.

L e u c i n -spezifische tRNAs werden in mindestens fünf Isoacceptoren mit Gipfel fraktionen 37 (I), 42 (II), 48 (III), 53 (IV) und 69 (V) aufgetrennt. tRNA^{Leu}_V kann infolge seines geringen relativen Anteils an der gesamten Leucin-Acceptoraktivität in diesen analytischen Chromatographien kaum aufgefunden werden, die Existenz eines nur mit hohen Kochsalzkonzentrationen zu eluierenden tRNA^{Leu}-Isoacceptors ist jedoch dadurch gesichert, daß bei der präparativen Fraktionierung von Gesamt-tRNA mit dem Ziel der Reindarstellung von tRNA^{Phe} und tRNA^{Tyr}_{II} eine Leucyl-tRNA als eine der wesentlichen Verunreinigungen auftritt (vgl. 3.8.3. sowie Raettig, Schmidt, Mahal, Kersten und Arnold, 1975). Möglicherweise wird in den Fraktionen um Fr. 59 ein sechster Isoacceptor eluiert, da hier die Radioaktivität (850 cpm/Fraktion) deutlich über dem Untergrund liegt. Von Vold (1972, 1973b) werden zwei unterschiedliche Elutionsprofile für Leucyl-tRNAs aus *B. subtilis* angegeben, von denen keines mit dem in dieser Arbeit reproduzierbar gefundenen übereinstimmt. Das Elutionsprofil von Leucin-spezifischen tRNAs aus *E. coli* weist fünf Isoacceptoren auf (Pearson et al., 1971), wobei der zuerst eluierte Isoacceptor ebenfalls

den höchsten relativen Anteil hat.

L y s y l -tRNAs werden in Form eines inhomogenen Hauptgipfels (Gipfelfraktion: Fr. 31) sowie zweier sehr kleiner Gipfel um Fr. 45 bzw. Fr. 52 eluiert. Die hintere Flanke des Hauptgipfels läßt vermuten, daß mindestens zwei Isoacceptoren, die unvollständig voneinander getrennt sind, hierin eluiert werden. Es wurde kein Hauptgipfel im hinteren Bereich des Chromatogramms gefunden, wie es von Vold (1972, 1973b) berichtet wurde. Diese Abweichung ist erklärbar durch die Verwendung unterschiedlicher Medien für die Bakterienzucht. Lazzarini und Santangelo (1967) weisen darauf hin, daß ein zweiter Gipfel dann nicht oder nur in sehr geringen Mengen gefunden wird, wenn die Zellen in synthetischen Medien ähnlich dem hier verwendeten Nakada-Medium gezüchtet werden.

Über die Auftrennung von M e t h i o n i n -spezifischen tRNAs wurde bereits ausführlich berichtet (Raettig, 1973). Unter den in dieser Arbeit verwendeten geänderten Bedingungen ist die Auftrennung in die formylierbare tRNA^{Met} - sie stellt die Initiations-tRNA für die Proteinsynthese dar - und die nicht formylierbare tRNA^{Met} - sie überträgt Methionin nur in wachsende Peptidketten - unvollständig; die Anwesenheit eines zweiten Isoacceptors zeigt sich lediglich in der inhomogenen, langsam fallenden hinteren Flanke des Hauptgipfels.

Das Elutionsprofil von P h e n y l a l a n y l -tRNAs ist ebenfalls beschrieben (Arnold, 1973; Raettig 1973). Als Hauptgipfel muß der um Fraktion 68 eluierte Isoacceptor angesehen werden. Vorkommen und Natur der früh eluierten Formen (geringe Menge um Fr. 37, ein deutlicher Gipfel um Fr. 47) wurden im Rahmen dieser Arbeit intensiv untersucht (vgl. 3.3.1.3., 3.3.2., 3.5.).

Für P r o l i n wurde eine spezifische tRNA gefunden (Gipfelfraktion: Fr. 34). Nicht reproduzierbar war das Auftreten eines zweiten Isoacceptors mit sehr geringem relativen Anteil, der um Fr. 44 eluiert wurde. Von Vold (1973a) wurde ein Haupt- und ein Nebengipfel beobachtet.

Die für S e r i n spezifischen tRNAs werden in drei Hauptfraktionen aufgetrennt. Zusätzlich wurden reproduzierbar mehrere, in geringen Mengen vorhandene tRNAs^{Ser} gefunden: in der Front des ersten Hauptgipfels, zwischen den ersten beiden Hauptgipfeln und hinter dem zweiten Hauptgipfel. In einigen Chromatographien wurde der zweite Hauptgipfel in zwei Isoacceptoren aufgetrennt, ähnlich wie von Vold (1973a) beschrieben. Drei Serin-spezifische tRNAs wurden von Doi et al. (1966) beobachtet, wobei das Auftreten des zuletzt eluierten Isoacceptors vom Medium des Zellwachstums abhing (vgl. 3.3.1.3. und 3.3.2.).

T h r e o n y l -tRNAs konnten in vier Isoacceptoren aufgelöst werden, von denen einer den weitaus größten Anteil hat. Das Elutionsprofil gleicht dem von Vold (1973a) angegebenen, weist jedoch zusätzlich einen Isoacceptor mit Gipfelfraktion 30 auf.

Das Elutionsprofil der für T r y p t o p h a n spezifischen tRNAs zeigt drei Isoacceptoren, von denen zwei nur in geringen Mengen vorkommen. Der aus Sporen extrahierte tRNA^{Trp}-Isoacceptor (Vold, 1973a), der mit hoher Kochsalzkonzentration eluiert wird, wurde nicht gefunden.

T y r o s i n -spezifische tRNAs von *B. subtilis* lassen sich in zwei Isoacceptoren auftrennen. Dies ist in Übereinstimmung mit zahlreichen Literaturbefunden (Vold, 1973a, 1973b; Sueoka und Hardy, 1968; Arceneaux und Sueoka, 1969; McMillian und Arceneaux, 1975). Die Änderungen der relativen Anteile beider Isoacceptoren in Abhängigkeit von den physiologischen Bedingungen des Zellwachstums sind in dieser Arbeit intensiv untersucht worden (vgl. 3.3.1.3., 3.3.2., 3.6.).

Für V a l i n wurden zwei spezifische tRNAs gefunden. Zahl und relative Anteile der Isoacceptoren sind in Übereinstimmung mit Vold (1973a).

Insgesamt wurden 45 tRNA - Acceptoren, spezifisch für insgesamt 18 Aminosäuren, gefunden. Werden die teilweise nur un-

deutlichen Schultern einzelner Gipfel hinzugenommen, so erhöht sich die Zahl der Acceptoren 51. Für *E. coli* wurden insgesamt 56 tRNA - Acceptoren gefunden (Muench und Saffille, 1968). Hierbei ist darauf hinzuweisen, daß es sich nur um eine Mindestzahl handeln kann, die durch das Auflösungsvermögen der verwendeten Analysenmethode unter den angegebenen Bedingungen begrenzt ist. Die angewendeten Bedingungen erlauben jedoch eine eindeutige Zuordnung der relativen Elutionsposition einzelner tRNA-Isoacceptoren sowie eine mehr als ausreichende Trennung derjenigen spezifischen tRNAs, die im weiteren Verlauf dieser Arbeit detailliert untersucht wurden.

3.3. Biosynthese spezifischer tRNAs in Abhängigkeit von den physiologischen Bedingungen des Zellwachstums

Die physiologischen Bedingungen für das Wachstum einer Bakterienkultur sind definiert durch

- i) die Zusammensetzung des Nährmediums.

Da sich die Zusammensetzung des Nährmediums während des Zellwachstums durch fortlaufenden Verbrauch der einzelnen Komponenten ändert, ergibt sich als weiterer Parameter

- ii) die Wachstumsphase.

Die Zusammensetzung des Nährmediums sowie

- iii) die Sauerstoffversorgung der Kultur und
- iv) die Temperatur

beeinflussen

- v) die Wachstumsgeschwindigkeit.

Die unter i) bis v) genannten Faktoren beeinflussen sich untereinander. Gezielte Änderungen im Wachstum ergeben sich durch

- vi) Zugabe von Antibiotika sowie
- vii) Reduktion der Konzentration einer für das Zellwachstum obligaten Substanz.

Alle genannten Parameter können die Biosynthese spezifischer tRNAs beeinflussen (zusammenfassender Bericht: Littauer und

Inouye, 1973). Im folgenden wurde an *Bacillus subtilis* untersucht,

- i) wie sich die Gabe des Antibiotikums Pactamycin zu einer wachsenden Kultur auf das Auftreten einzelner tRNA-Isoacceptoren auswirkt;
- ii) welche Änderungen im Auftreten einzelner tRNA-Isoacceptoren durch Änderungen der Sauerstoffversorgung der Kultur hervorgerufen werden.

In Einzelfällen wurde die Abhängigkeit des Auftretens von tRNA-Isoacceptoren von der Zusammensetzung des Nährmediums bestimmt.

3.3.1. tRNA-Isoacceptoren unter dem Einfluß von Pactamycin

Pactamycin ist ein Antibiotikum, das am Ribosom angreift und damit die Proteinsynthese hemmt. Unter seinem Einfluß kommt es zu einer Entkopplung der strengen Kontrolle zwischen Protein- und RNA-Synthese. Experimente an wachsenden *B. subtilis*-Kulturen zeigen, daß die unter Einfluß von Pactamycin neu synthetisierte tRNA weniger methyliert wird als tRNA in Kontrollkeimen (Schmidt, 1973). Die aus mit Pactamycin behandeltem *B. subtilis* isolierte tRNA läßt sich in vitro sowohl homolog als auch heterolog (mit Methyltransferasen aus *E. coli*) methylieren (Kersten et al., 1968; Arnold, 1973; Arnold et al., 1975; vgl. 3.4.). In früheren Arbeiten wurde untersucht, ob sich das Fehlen von Modifikationen bei Methionin- und Phenylalanin-spezifischen tRNAs chromatographisch dahingehend auswirkt, daß Verschiebungen im Elutionsprofil oder neue tRNA-Isoacceptoren auftreten. Für die tRNAs^{Met} wurden keine Änderungen beobachtet (Raettig, 1973), für die Phenylalanin-spezifischen tRNAs wurden Änderungen im quantitativen Verhältnis festgestellt (Arnold, 1973; Raettig, 1973; Kersten, 1971).

Im folgenden wird untersucht, wie sich die durch Pactamycin bewirkte Untermodifizierung der Gesamt-tRNA auf die für andere Aminosäuren spezifischen tRNAs auswirkt. Die tRNA-Proben wurden aus Keimen isoliert, die in einem 20 l Fermenter unter guter Belüftung (= schnelle Wachstumsgeschwindigkeit) gezüchtet wurden. Aufgrund der Ergebnisse werden die tRNAs in drei

Gruppen eingeteilt:

- i) tRNAs, deren Elutionsprofil nach Pactamycineinwirkung unverändert bleibt (3.3.1.1.),
- ii) tRNAs, deren Elutionsprofil nach Pactamycineinwirkung geringfügig verändert ist (3.3.1.2.),
- iii) tRNAs, bei denen durch Pactamycinbehandlung das quantitative Verhältnis der Isoacceptoren verändert ist (3.3.1.3.).

3.3.1.1. tRNA-Isoacceptoren, deren Elutionsprofil nach Pactamycineinwirkung unverändert bleibt

In getrennten Chromatographien wurden die RPC-5-Elutionsprofile für tRNAs aus unbehandeltem *B. subtilis* (Kontrolle) und aus mit Pactamycin behandeltem *B. subtilis* (PA) untersucht. Für die größte Zahl von spezifischen tRNAs wurden keine Unterschiede in der Elutionsposition und im quantitativen Verhältnis der Isoacceptoren gefunden. Es handelt sich dabei um die für die Aminosäuren

Arg
Asp
Aspn
Ile
Lys
Met
Pro
Thr
Trp
Val

spezifischen tRNAs. Die Elutionsprofile sind in Anhang 1 zusammengestellt. Die Zuordnung der Radioaktivitätsgipfel zu definierten Fraktionsnummern erfolgte in der unter 3.2. beschriebenen Weise.

Obwohl für diese tRNAs keine Unterschiede gegenüber den Kontrollen gefunden wurden, darf hieraus nicht der Schluß gezogen werden, daß diese Isoacceptoren unter Pactamycineinwirkung in normalem Ausmaß modifiziert werden. Es ist lediglich die Aussage erlaubt, daß eine sehr empfindliche Analysenmethode (RPC-5-Chromatographie) keine Unterschiede aufzeigt.

3.3.1.2. tRNA-Isoacceptoren, deren Elutionsprofil nach Pactamycineinwirkung geringfügig verändert ist

Die für G l u t a m i n s ä u r e spezifischen tRNAs lassen sich leicht in zwei Hauptgipfel auftrennen (Abb. 4). Nach ihnen kann bei der Chromatographie von tRNAs aus mit Pactamycin behandelten Keimen ein weiterer Isoacceptor eluiert werden, dessen relativer Anteil gering ist. Dieser Radioaktivitätsgipfel wurde reproduzierbar in drei verschiedenen Präparationen gefunden. In der Kontrolle sind keine sicheren Hinweise für das Vorhandensein eines derartigen tRNA^{Glu}-Isoacceptors zu finden. Ein nicht reproduzierbares Auftreten eines dritten tRNA^{Glu}-Isoacceptors in Gesamt-tRNA aus in der logarithmischen Wachstumsphase geernteten *B. subtilis* wurde von Vold berichtet (1973a).

3.3.1.3. Änderung im quantitativen Verhältnis von tRNA-Isoacceptoren nach Pactamycineinwirkung

Für die aus mit Pactamycin behandeltem *B. subtilis* isolierte tRNA wurden Änderungen im quantitativen Verhältnis der Isoacceptoren bei für folgende Aminosäuren spezifischen tRNAs beobachtet:

Alanin
Glycin
Histidin
Leucin
Phenylalanin
Serin
Tyrosin.

Für A l a n i n werden in den Kontrollpräparationen zwei Isoacceptoren gefunden, deren Gipfel in Fraktion 36 bzw. 40/41 eluiert werden (Abb. 5). Die entsprechenden tRNAs aus behandelten Keimen werden signifikant später eluiert, hierbei ist das quantitative Verhältnis zwischen dem ersten und dem zweiten Gipfel erheblich zugunsten des zweiten verschoben. Der zweite Gipfel der Kontroll-tRNA wird bei derselben Kochsalzkonzentration wie der erste Gipfel der PA-tRNA eluiert; ob es sich hierbei um identische tRNAs handelt, ist ungeklärt.

G l y c i n -spezifische tRNAs (Abb. 6) können in drei Isoacceptoren aufgetrennt werden. In der Kontroll-tRNA liegt

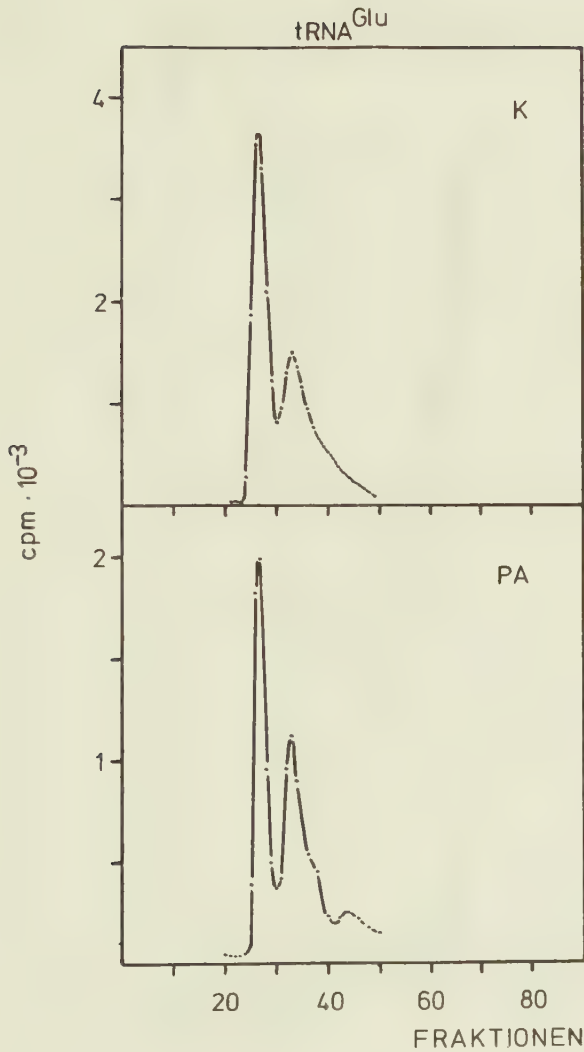


Abb. 4: RPC-5-Elutionsprofile von ^{14}C -Glu-tRNAs^{Glu} aus Kontrollkeimen (K) und aus Pactamycin behandelten Keimen (PA). Chromatographiebedingungen: Standardsäule

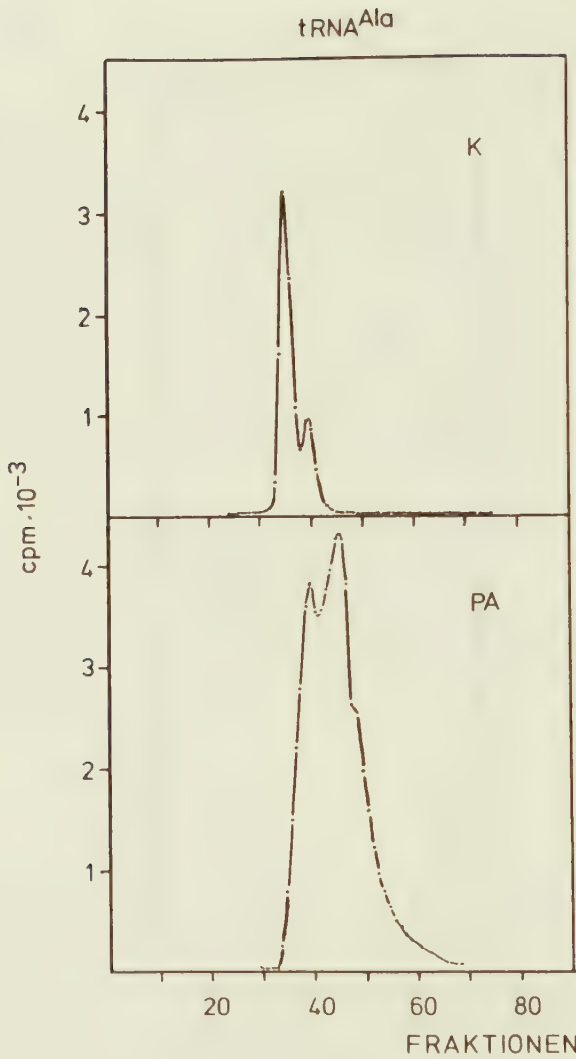


Abb. 5: RPC-5-Elutionsprofile von ^{14}C -Ala- $tRNA^{Ala}$ aus Kontrollkeimen (K) und aus Pactamycin behandelten Keimen (PA). Chromatographiebedingungen: Standardsäule

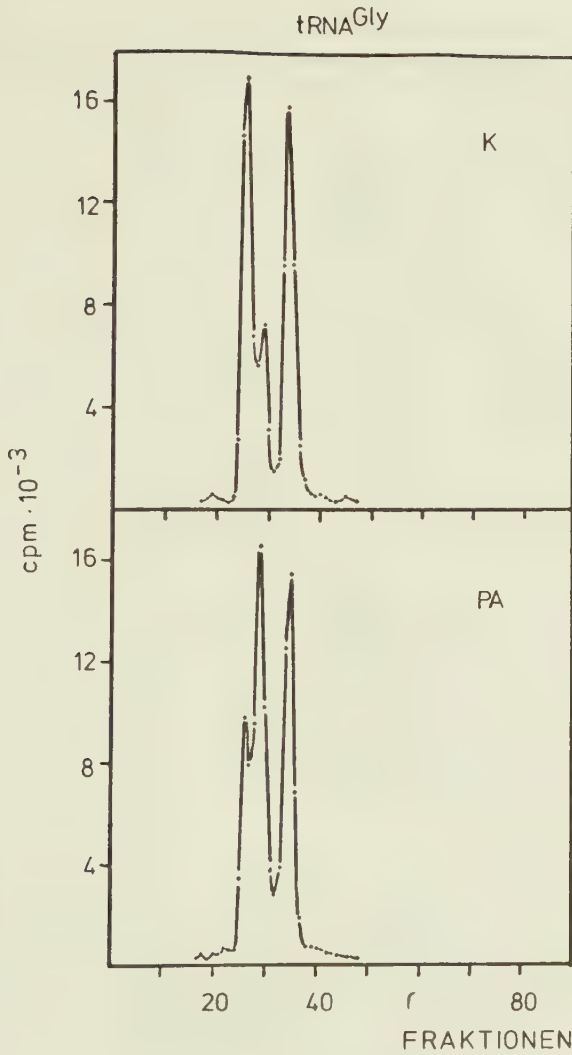


Abb. 6: RPC-5-Elutionsprofile von ^{14}C -Gly- $tRNA^{Gly}$ aus Kontrollkeimen (K) und aus Pactamycin behandelten Keimen (PA). Chromatographiebedingungen: Standardsäule

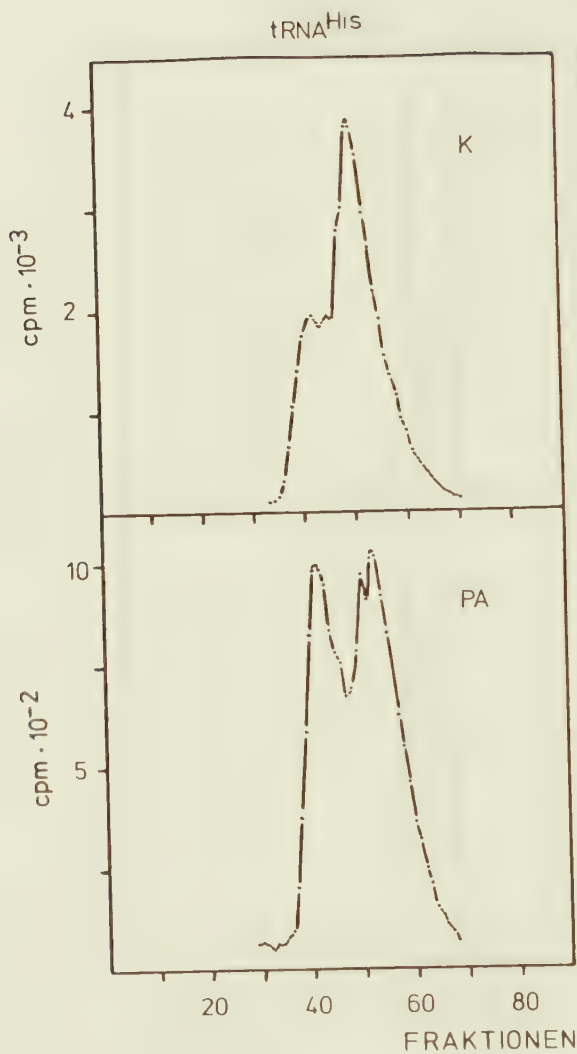


Abb. 7: RPC-5-Elutionsprofile von ^{14}C -His-tRNAs^{His} aus Kontrollkeimen (K) und aus Pactamycin behandelten Keimen (PA). Chromatographiebedingungen: Standardsäule

zwischen zwei gleich hohen Gipfeln (Fraktion 26 bzw. 34) ein erheblich kleinerer (Fraktion 29). In der PA-tRNA ist das Verhältnis der ersten beiden Gipfel zueinander vertauscht, sie werden jedoch bei derselben Kochsalzkonzentration wie die entsprechenden Kontroll-tRNAs eluiert. Der Anteil des dritten Gipfels an der gesamten Glycin-Acceptoraktivität bleibt unter Pactamycineinwirkung gleich, die Elutionsposition ist jedoch gegenüber der Kontrolle um eine Fraktion retardiert.

Die H i s t i d i n - spezifischen tRNAs aus Kontrollkeimen lassen sich in zwei Isoacceptoren auftrennen, bei der Chromatographie der His-tRNAs aus Pactamycin behandelten Keimen ergeben sich drei Isoacceptoren (Abb. 7), von denen allenfalls der erste Gipfel mit einem Gipfel der Kontroll-tRNA korrelierbar ist; die beiden anderen sind gegenüber den His-tRNA-Isoacceptoren der Kontrolle retardiert. Auffallend ist, daß der letzte Gipfel sowohl in den Kontroll- als auch in den PA-tRNAs eine weit herausgezogene hintere Flanke aufweist.

Bei den für L e u c i n spezifischen tRNAs (Abb. 8) ergibt sich im Anteil des zweiten Gipfels an der gesamten Leucin-Acceptoraktivität eine drastische Änderung. Während in verschiedenen Kontrollpräparationen die Höhe des zweiten Gipfels nur die Hälfte des ersten Gipfels erreicht, erhöht sich dieses Verhältnis in PA-tRNAs bis zum eineinhalbfachen des ersten Gipfels. Die Ablösekonzentrationen aller tRNA^{Leu}-Isoacceptoren bleiben gleich.

Die Chromatographie der für P h e n y l a l a n i n spezifischen tRNAs zeigt sowohl für Kontroll- als auch für PA-tRNAs zwei Hauptgipfel (Abb. 9). Während der Anteil des ersten Gipfels an der gesamten Radioaktivität in der Kontrolle meistens zwischen 10 und 20 % lag, konnten für PA-tRNAs Werte bis zu 37 % erhalten werden. Natur und Vorkommen dieser Isoacceptoren sind in den in Abschnitt 3.5. beschriebenen Experimenten detailliert untersucht worden.

Bei den für S e r i n spezifischen tRNAs erhöht sich unter Pactamycineinwirkung der relative Anteil des zuerst eluierten Isoacceptors (Abb. 10). Der relative Anteil der nur in geringen Mengen vorkommenden und zum Teil nur als Schultern erkenn-

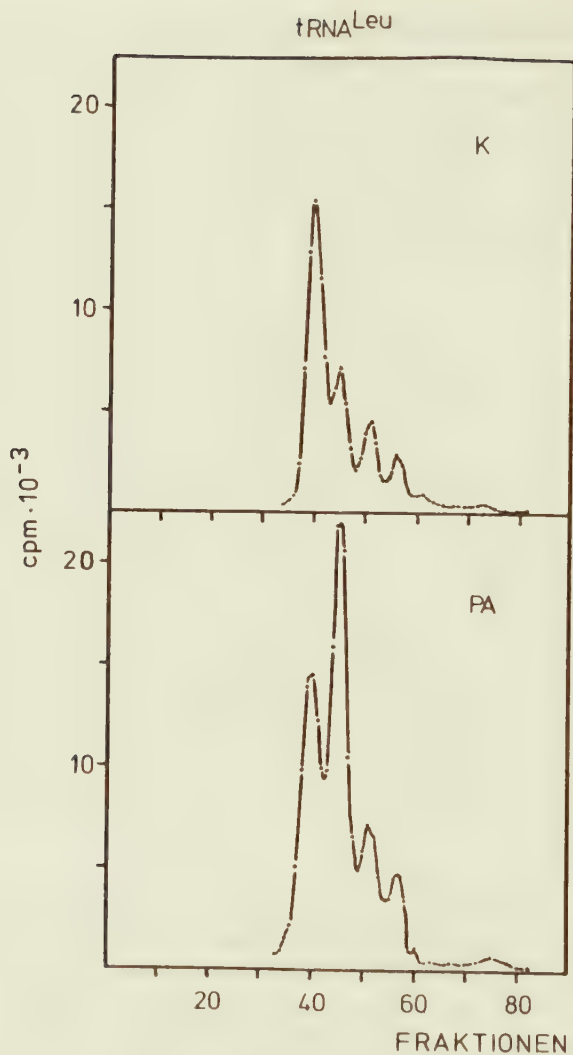


Abb. 8: RPC-5-Elutionsprofile von ^{14}C -Leu-tRNAs^{Leu} aus Kontrollkeimen (K) und aus Pacatmycin behandelten Keimen (PA). Chromatographie-Bedingungen: Standardsäule

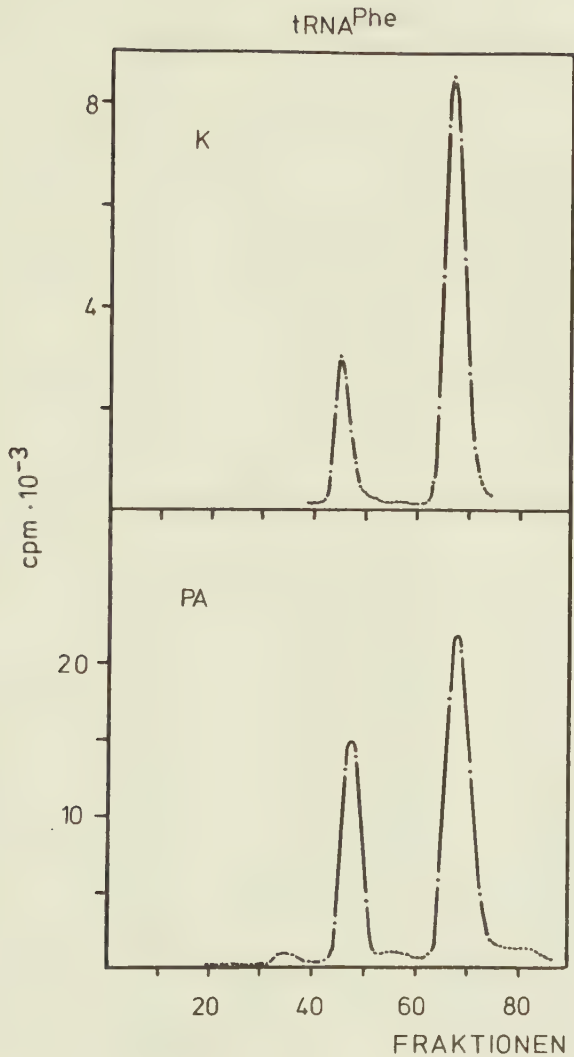


Abb. 9: RPC-5-Elutionsprofile von ^{14}C -Phe-tRNAs^{Phe} aus Kontrollkeimen (K) und aus Pactamycin behandelten Keimen (PA). Chromatographiebedingungen: Standardsäule

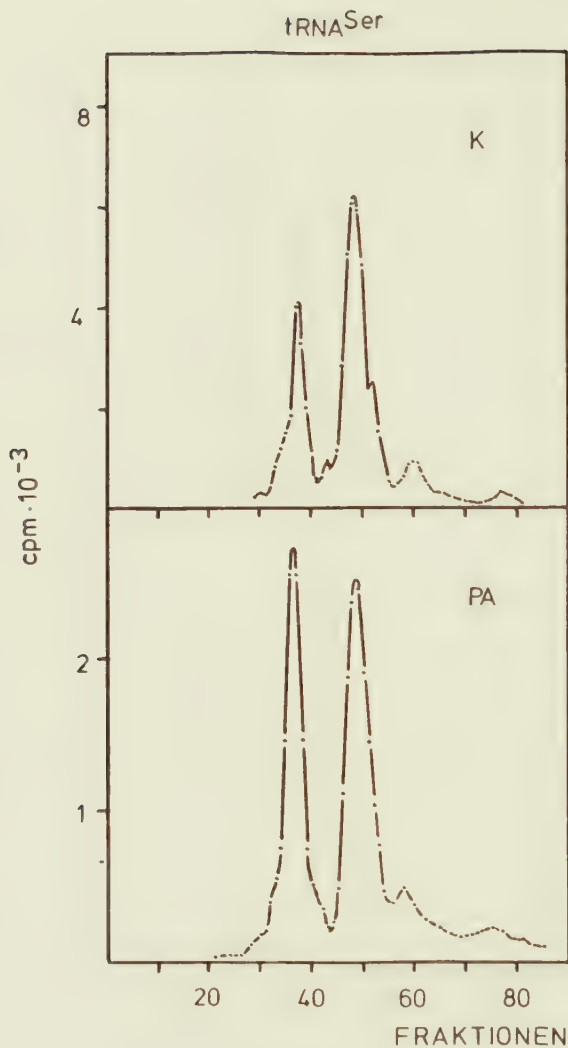


Abb. 10: RPC-5-Elutionsprofile von ^{14}C -Ser-tRNAs^{Ser} aus Kontrollkeimen (K) und aus Pactamycin behandelten Keimen (PA). Chromatographiebedingungen: Standardsäule

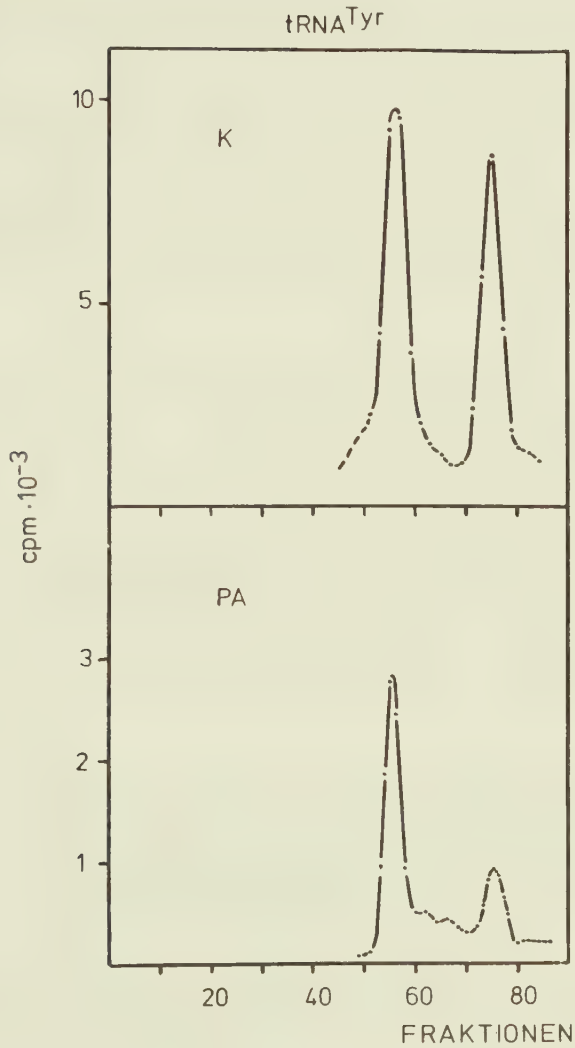


Abb. 11: RPC-5-Elutionsprofile von ^{14}C -Tyr-tRNAs^{Tyr} aus Kontrollkeimen (K) und aus Pactamycin behandelten Keimen (PA). Chromatographiebedingungen: Standardsäule

baren Isoacceptoren scheint unverändert. Die Elutionspositionen der tRNA^{Ser}-Isoacceptoren bleiben gleich.

Die T y r o s i n-Acceptoraktivität, schließlich, verteilt sich sowohl in der Kontroll-tRNA als auch in Pactamycin-tRNA auf zwei Isoacceptoren (Abb. 11). Der relative Anteil von tRNA^{Tyr} ist in PA-tRNA höher, es wurden Werte von 90 % erhalten. Das Verhältnis der tRNA^{Tyr}-Isoacceptoren wurde für eine Reihe von verschiedenen physiologischen Bedingungen des Zellwachstums genauer untersucht, die Resultate sind in Abschnitt 3.6. beschrieben.

3.3.2. Änderung der Elutionsprofile spezifischer tRNAs unter dem Einfluß unterschiedlicher Belüftungsbedingungen

Die Durchlüftung einer wachsenden Bakterienkultur hat großen Einfluß auf die Wachstumsgeschwindigkeit (Abb. 12). Bei starker Belüftung wurden für *B. subtilis* Generationszeiten von etwa 45 min gemessen. Bei schwacher Belüftung der Kultur ist eine logarithmische Wachstumsphase nur unmittelbar nach dem Übergang von der log-Phase realisiert. Die Generationszeit nimmt im weiteren Verlauf des Wachstums ständig zu, und die stationäre Phase wird bei einer erheblich geringeren Zelldichte erreicht.

Im folgenden wurde untersucht, ob die durch veränderte Belüftungsbedingungen hervorgerufenen unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten das Vorkommen von tRNA-Isoacceptoren beeinflussen. Die zu vergleichenden tRNA-Proben wurden aus Keimen isoliert, die entweder in einem 20 l Fermenter unter starker Belüftung oder in einem 500 l Fermenter der Firma E. Merck bei schlechter Belüftung gezüchtet wurden. Die von Merck bezogenen Keime hatten nach 16 Stunden die stationäre Phase erreicht (Dr. Metz, persönliche Mitteilung), im 20 l Fermenter wird diese Wachstumsphase nach 7 bis 8 Stunden erreicht. Die tRNA-Isoacceptoren wurden wiederum durch RPC-5-Chromatographie analysiert.

Die für Phenylalanin, Serin und Tyrosin spezifischen tRNAs zeigten in diesem Vergleich deutliche Unterschiede, die in

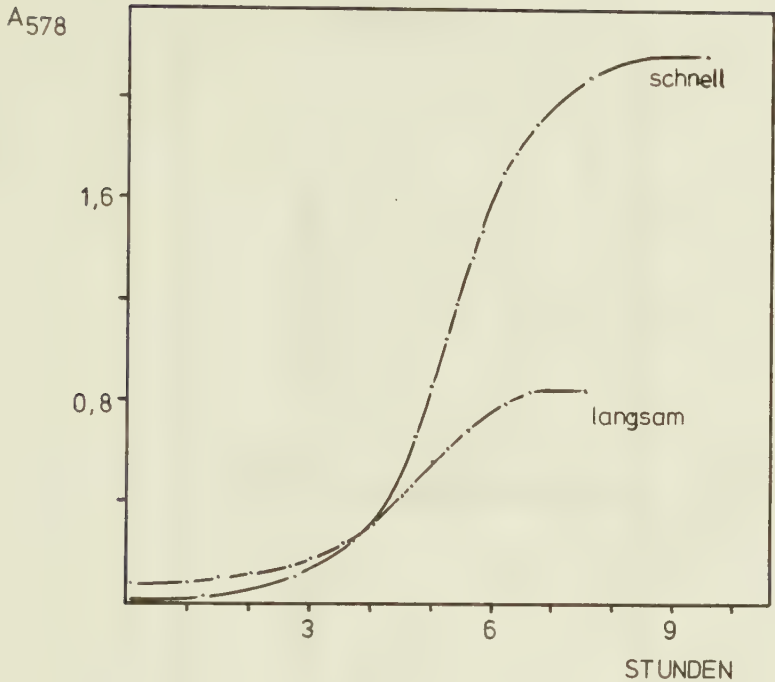


Abb. 12: Wachstumskurven von *Bacillus subtilis* W 23 in Glucose-Salz-Medium nach Nakada (1965). Die Kulturen wurden in einem New Brunswick Gyrotary Shaker bei 250 Upm (gute Belüftung $\hat{=}$ schnelle Wachstumsgeschwindigkeit) oder bei 180 Upm (geringe Belüftung $\hat{=}$ geringe Wachstumsgeschwindigkeit) gezüchtet.

den Abbildungen 13 bis 15 dokumentiert sind.

Nach langsamem Wachstum enthalten die Keime nur eine sehr geringe Menge von phe-tRNAs^{Phe}, die bei niedrigen Kochsalzkonzentrationen eluiert werden (Abb. 13), nach schnellem Wachstum liegt der relative Anteil dieser Isoacceptoren erheblich höher.

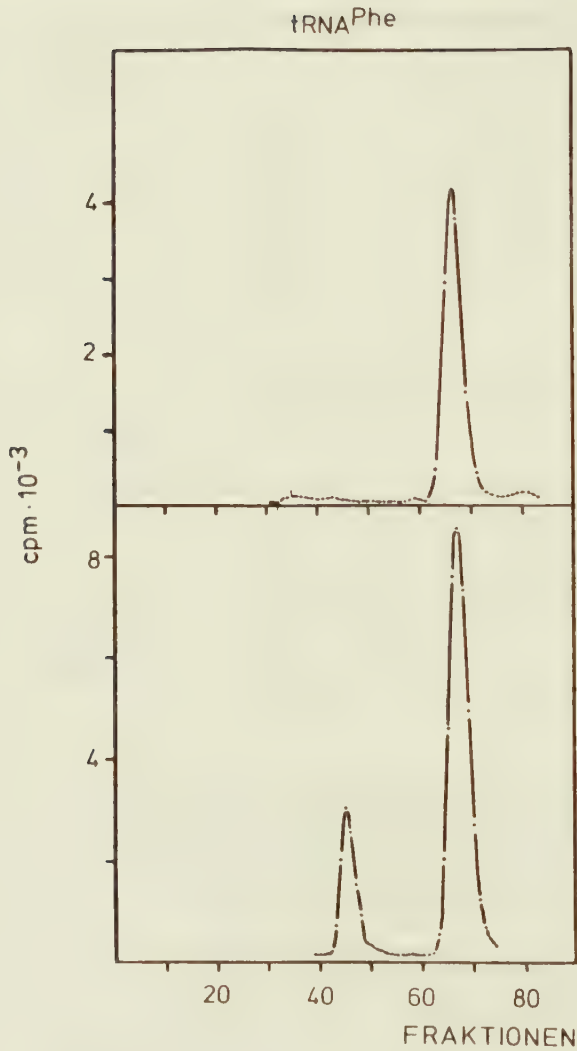


Abb. 13: RPC-5-Elutionsprofile von ^{14}C -Phe-tRNAs^{Phe} aus langsam gewachsenen Keimen (oben) und aus schnell gewachsenen Keimen (unten). Chromatographiebedingungen: Standardsäule

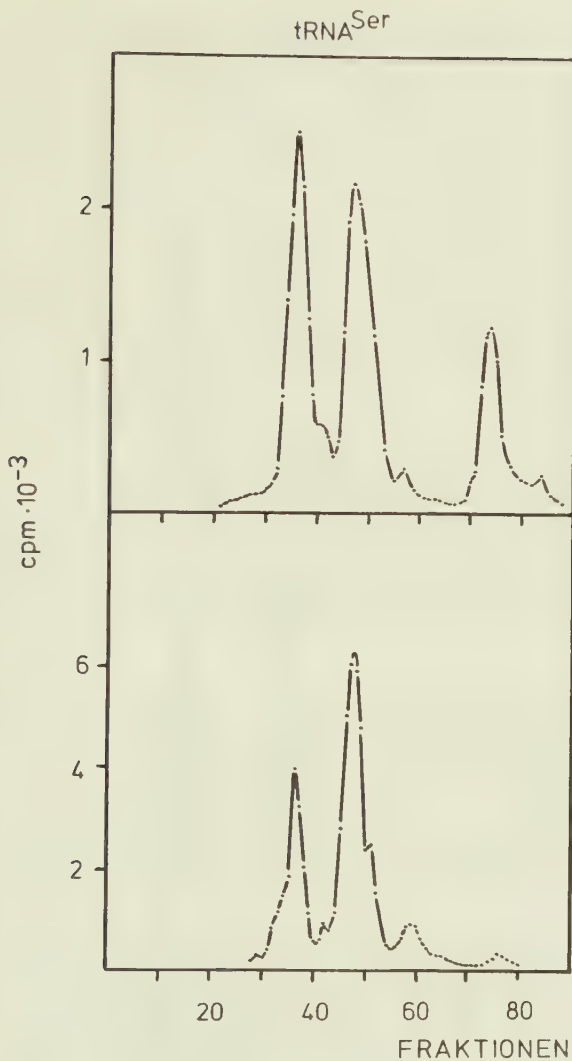


Abb. 14: RPC-5-Elutionsprofile von ^{14}C -Ser-tRNAs^{Ser} aus langsam gewachsenen Keimen (oben) und aus schnell gewachsenen Keimen (unten). Chromatographiebedingungen: Standardsäule

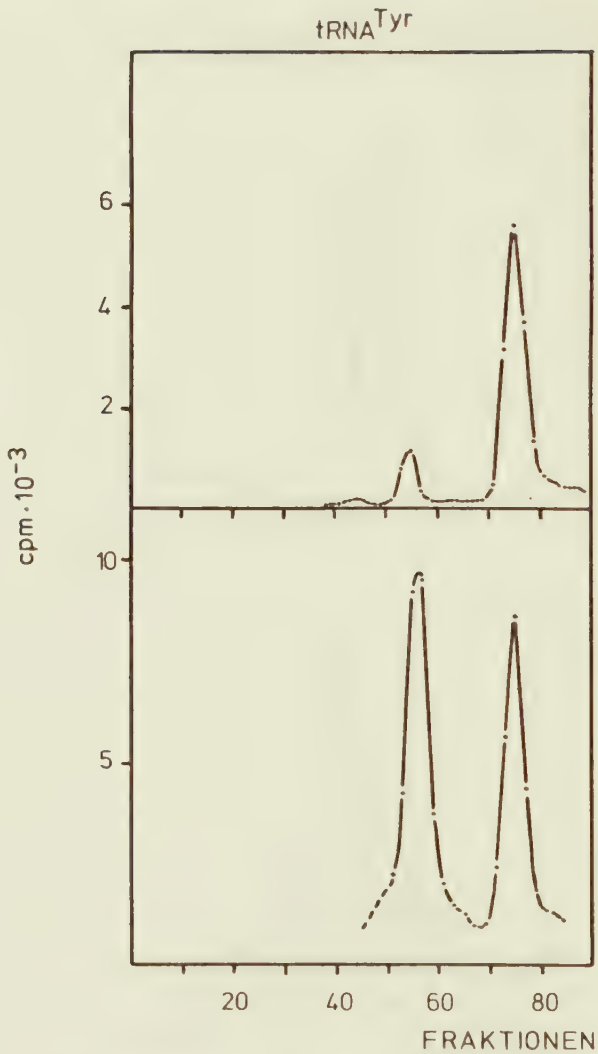


Abb. 15: RPC-5-Elutionsprofile von ^{14}C -Tyr-tRNAs^{Tyr} aus langsam gewachsenen Keimen (oben) und aus schnell gewachsenen Keimen (unten). Chromatographiebedingungen: Standardsäule

Das Elutionsprofil der für Serin spezifischen tRNAs zeigt nach schnellem Wachstum der Keime einen nur in geringen Mengen vorkommenden Isoacceptor, dessen Gipfel in Fr. 75 eluiert wird. Nach langsamem Wachstum ist der Anteil dieses Isoacceptors auf über 20 % der gesamten eluierten Radioaktivität erhöht (Abb. 14).

Bei den Tyrosin-spezifischen tRNAs ist das Verhältnis der beiden Hauptgipfel zueinander nach langsamem Zellwachstum gegenüber tRNA aus schnell gezüchteten Keimen vertauscht. Nicht der zuerst eluierte, sondern der gegen Ende des Salzgradienten eluierte Isoacceptor stellt die Hauptmenge an tRNA^{Tyr} dar (Abb. 15).

In derselben Weise wurden die weiteren tRNA-Isoacceptoren untersucht, bei denen Unterschiede im Elutionsprofil zwischen tRNA aus Kontrollkeimen und tRNA aus behandelten Keimen beobachtet worden waren (vgl. 3.3.1.2. und 3.3.1.3.). Für diese tRNAs konnte keine Abhängigkeit der Verteilung der Isoacceptoren von der Geschwindigkeit des Zellwachstums festgestellt werden.

omit lassen sich die hier dargestellten Ergebnisse mit denen des Abschnitts 3.3.1. folgendermaßen zusammenfassen:

Die für tRNA^{Ala}, tRNA^{Glu}, tRNA^{Gly}, tRNA^{His} und tRNA^{Leu} beschriebenen Änderungen der Elutionsprofile sind eindeutig eine Folge der Pactamycinbehandlung und unabhängig von der Geschwindigkeit des Zellwachstums.

Die Änderungen der Elutionsprofile von tRNA^{Phe}, tRNA^{Ser} und tRNA^{Tyr} können - wenn tRNA aus langsam gewachsenen Keimen als Basis herangezogen wird - sowohl durch schnelles Wachstum als auch durch Pactamycinbehandlung bewirkt werden. Schnelles Wachstum und gleichzeitige Pactamycinbehandlung führen zu einer Verstärkung der beobachteten Effekte.

Es erhebt sich die Frage, ob die Änderungen im Auftreten einzelner Isoacceptoren auf fehlende Modifizierungen desselben

Polynucleotids oder auf differentielle Synthese heterogenetischer tRNAs zurückzuführen sind. Um einer Antwort näher zu kommen, wurde zunächst die Methylierbarkeit von Gesamt-tRNA aus mit Antibiotika behandelten *B. subtilis* geprüft.

3.4. Nachträgliche Methylierung von tRNA aus behandeltem *B. subtilis*

Methylgruppenarme tRNA häuft sich in einer methioninauxotrophen *E. coli* rel^- -Mutanten an, wenn die Keime im Methioninmangel gezüchtet werden (Fleissner und Borek, 1962). rel^- -Mutanten zeichnen sich dadurch aus, daß bei Aminosäuremangel die strenge Kontrolle zwischen Protein- und RNA-Synthese aufgehoben ist. Für *B. subtilis* sind solche met^- rel^- Mutanten noch nicht bekannt. Die strenge Kontrolle zwischen RNA- und Proteinsynthese läßt sich jedoch durch Gabe von Hemmstoffen der Proteinsynthese wie z. B. Chloramphenicol aufheben. Bei geeigneten Hemmstoffkonzentrationen wird die Proteinsynthese gehemmt und weiter RNA synthetisiert. Es wurde nun geprüft, ob tRNA, die in *B. subtilis* met^- ind^- rel^+ bei zwölfstündigem Methioninmangel in Gegenwart von Chloramphenicol (2 mg/l) entsteht, sich in einem zellfreien System nachmethylieren läßt. Diese tRNA wird im folgenden als "CM-tRNA" bezeichnet. Daneben wurde tRNA aus mit Pactamycin behandeltem *B. subtilis* W 23 (PA-tRNA) als Acceptor für Methylgruppen in einem zellfreien System eingesetzt.

3.4.1. Heterologe Methylierung von CM-tRNA und PA-tRNA mit *E. coli* Enzym und SAM

Die Methylierung von tRNA aus *B. subtilis* mit Enzymen aus *E. coli* und ^{14}C -SAM als Cosubstrat wurde durchgeführt, weil die SAM-abhängige $m^5\text{U}$ tRNA Methyltransferase auf $m^5\text{U}$ arme tRNA aus *B. subtilis* Methylgruppen überträgt.

Diese Methylierung findet in *B. subtilis* durch eine Tetrahydrofolat-abhängige Methyltransferase statt (Arnold et al., 1975a; Kersten et al., 1975). Für die quantitative Messung der Tetrahydrofolsäure-abhängigen Methylierung steht noch kein geeignetes homologes Testsystem zur Verfügung, das eine quantitative Methylierung von Uracil zu 5-Methyluracil ermöglicht. Die heterologen Extrakte aus *E. coli* methylieren in *B. subtilis* tRNA nicht nur Uracil zu 5-Methyluracil, sondern sie führen auch zusätzlich Methylgruppen ein. Das Ausmaß der Methylierung von Kontroll-tRNA muß deshalb bei der Berechnung des Untermethylierungsgrades von CM-tRNA und PA-tRNA in Abzug gebracht werden.

Tabelle 3: Ausmaß der Methylierung von CM-tRNA und PA-tRNA aus *B. subtilis* durch S-100-Extrakte von *E. coli*. Cosubstrat: ^{14}C -SAM

Substratmenge pro Ansatz	pmol $\text{CH}_3/\text{A}_{260}$ tRNA		
	1,0 A_{260}	0,5 A_{260}	0,25 A_{260}
Substrat			
CM-tRNA	--	656	804
PA-tRNA	453	513	543
Kontrolle	--	60	--

Die in Tabelle 3 zusammengestellten Ergebnisse zeigen, daß sowohl CM-tRNA als auch PA-tRNA Methylgruppen aufnimmt. Hierbei ist CM-tRNA ein besserer Methylgruppenacceptor als PA-tRNA. Hohe Substratkonzentrationen setzen die Methylierbarkeit herab, ähnlich, wie es bei der homologen Methylierung von methylgruppendifizienter tRNA aus *E. coli* beobachtet wurde (Kersten und Kersten, 1974). Eine weitere Herabsetzung der Substratmenge konnte wegen Erreichen der Nachweisgrenze nicht vorgenommen werden.

3.4.2. Homologe, SAM-abhängige Methylierung von CM-tRNA und PA-tRNA

Wegen des Fehlens eines Testansatzes, der die quantitative Messung der Tetrahydrofolat-abhängigen Methylierung zu 5-Methyluracil erlaubt hätte (vgl. 3.4.1.), wurde in dieser Arbeit nur die SAM-abhängige homologe Methylierung gemessen (Tab. 4).

Tabelle 4: Ausmaß der SAM-abhängigen, homologen Methylierung von CM-tRNA und PA-tRNA aus *B. subtilis*. Die Substratmenge lag zwischen 0,4 und 0,6 A₂₆₀ pro Standardansatz.

Substrat	pmol CH ₃ /A ₂₆₀ tRNA			Mittelwert
CM-tRNA	48	40	43	44
PA-tRNA	25,8	22,2	20,4	22,6

Es wird deutlich, daß auch im homologen System beide Substrate geringe, aber signifikante Mengen an Methylgruppen aufnehmen. Auch im homologen System ist CM-tRNA ein besserer Methylgruppenacceptor als PA-tRNA. Die Werte für PA-tRNA korrelieren gut mit den von Arnold (1973) angegebenen Daten. Die bessere Aufnahme von Methylgruppen der CM-tRNA gegenüber PA-tRNA ist dadurch zu erklären, daß in der für die Chloramphenicolbehandlung gewählten methioninauxotrophen Mutanten durch Methioninentzug zusätzlich zur Aufhebung der Kontrolle zwischen RNA- und Proteinsynthese ein Mangel am Cosubstrat SAM geschaffen wurde.

3.4.3. RPC-5-Chromatographie von PA-tRNA nach Methylierung mit *B. subtilis* Extrakten

Wird eine in vivo CH₃-markierte tRNA aus *B. subtilis* an RPC-5 chromatographiert, so zeigt ein Vergleich des Profils der UV-Absorption - als Meßgröße für die Nucleinsäure-

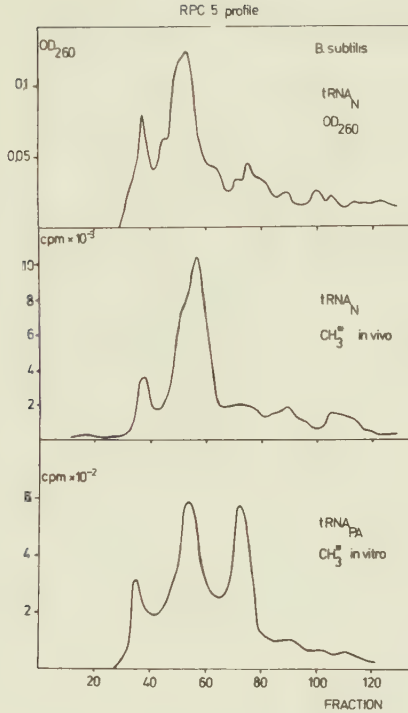


Abb. 16: RPC-5-Elutionsprofile

- A: Profil der UV-Absorption
- B: Profil der säurefällbaren Radioaktivität einer in vivo ¹⁴C-CH₃ markierten tRNA
- C: Profil der säurefällbaren Radioaktivität von PA-tRNA nach in vitro Methylierung mit homologem S-100-Extrakt und ¹⁴C-SAM als Coenzym.

Chromatographiebedingungen: wie Standardsäule, das Fraktionsvolumen betrug lediglich 3 ml.

konzentration im Eluat (Abb. 16 A) - mit dem Profil der säurefällbaren Radioaktivität (Abb. 16 B), daß alle RNA-Fraktionen etwa dieselbe Anzahl an Methylgruppen tragen.

Wird PA-tRNA in einem präparativen Methylierungsansatz mit ^{14}C -SAM und homologem Enzymextrakt umgesetzt und anschließend an RPC-5 chromatographiert (Abb. 16 C), so fällt ein Bereich des Chromatogramms heraus (Fraktionen 70 bis 80), der eine deutlich höhere spezifische Aktivität als eine entsprechende Kontrolle aufweist. Durch Inkubation einer in vivo mit Methylgruppen markierten tRNA im Methylierungsansatz und anschließender Auftrennung an RPC-5 (ohne Abb.) konnte ausgeschlossen werden, daß dieser Bereich als Artefakt bei der in vitro Methylierung entsteht. Die Fraktionen 70 - 80 enthalten somit RNA, die bei der homologen SAM-abhängigen Methylierung erheblich mehr Methylgruppen aufnimmt als die übrigen RNA-Fraktionen. Im folgenden wird dieser Bereich genauer charakterisiert.

3.4.4. RPC-5-Chromatographie von PA-tRNA nach Methylierung mit E. coli-Extrakten

Durch Methylierung mit E. coli-Extrakten und ^{14}C -SAM kann in PA-tRNA aus B. subtilis auch 5-Methyluracil eingeführt werden, eine Methylierung, die im homologen System Tetrahydrofolat-abhängig abläuft (vgl. 3.4.1.) und bei der in 3.4.3. beschriebenen Methylierung nicht erfaßt wurde. Die Analyse von heterolog methylierter PA-tRNA an RPC-5 (Abb. 17) macht deutlich, daß im Vergleich zur Kontroll-tRNA nach heterologer Methylierung ein Bereich erhöhter Acceptoraktivität für Methylgruppen erhalten bleibt. In der heterolog methylierten Kontroll-tRNA treten die Methylgruppen gehäuft in dem Bereich auf, in dem neben tRNA^{Gly} und tRNA^{Glu} die formylierbare methioninspezifische tRNA, $\text{tRNA}_f^{\text{Met}}$, eluiert wird. Von isolierter $\text{tRNA}_f^{\text{Met}}$ aus B. subtilis konnte gezeigt werden, daß sie durch E. coli-Extrakte in hohem Maße zu 7-Methylguanin und 2'O-Methylcytosin methyliert wird (Arnold, Mahal und Kersten, unveröffentlicht).

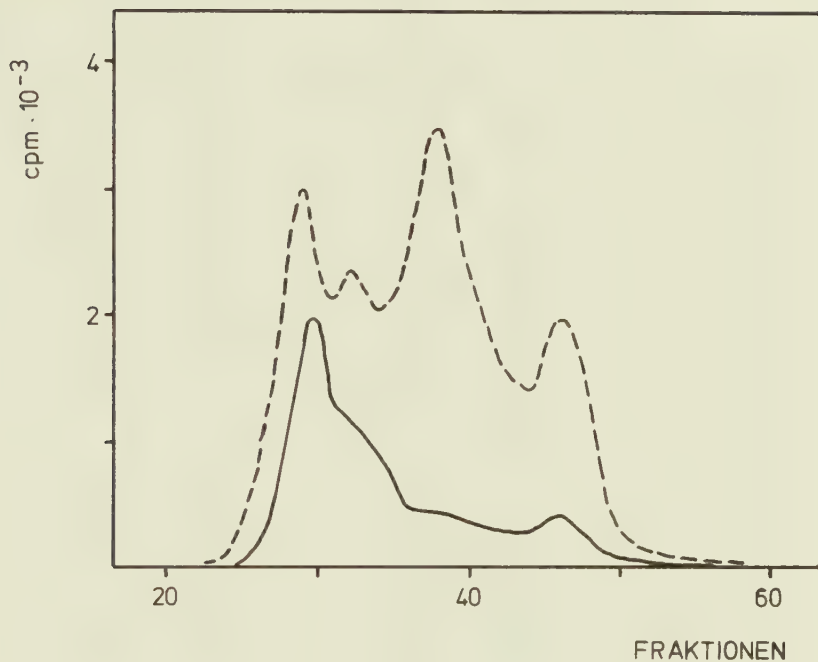


Abb. 17: RPC-5-Elutionsprofile von *B. subtilis*-tRNA nach Methylierung mit S-100-Extrakten aus *E. coli* und ¹⁴C-SAM. Chromatographiebedingungen: Standardsäule.

- Profil der säurefällbaren Radioaktivität von methylierter Kontroll-tRNA
- - - Profil der säurefällbaren Radioaktivität von methylierter PA-tRNA

3.4.5. Größenbestimmung der RNA-Fraktion mit erhöhter Methylierbarkeit

Es wurde untersucht, ob die RNA-Fraktionen, die sich besonders gut methylieren lassen, Vorläufer von reifen tRNAs enthalten. Die bislang gut charakterisierten Vorläufer, der Prolin-Serin-Vorläufer des Phagen T 4 (Barrell et al., 1974) und besonders der su_3^+ tRNA^{Tyr} Vorläufer aus E. coli (Schaefer et al., 1973), enthalten wenige Modifizierungen und sind Substrat für eine Reihe von modifizierenden Enzymen. Zudem sind sie erheblich größer als tRNAs und lassen sich durch Molekularsiebe von tRNAs trennen. Auch nach Chloramphenicolbehandlung von E. coli wurden tRNA-Vorläufer gefunden, die durch Chromatographie an Sephadex G-200 von tRNA abgetrennt und anschließend an RPC-5 aufgetrennt wurden (Dijk und Singhal, 1973).

Die aus den Fraktionen 70 bis 80 (Abb. 16 C) isolierte RNA wurde an Ultrogel AcA 34 - einem Sephadex G-200 entsprechenden Molekularsieb - chromatographiert. Hierbei waren (Abb. 18) UV-Elutionsprofil und Radioaktivitätselutionsprofil deckungsgleich; das Elutionsvolumen entsprach demjenigen, das bei der vorherigen Eichung der Säule für tRNA gefunden wurde. Somit wurden keine Moleküle gefunden, deren Molekulargewichte größer sind als das von reifer tRNA.

3.4.6. Zuordnung von spezifischen tRNAs zum Bereich erhöhter Acceptoraktivität für Methylgruppen

Die Zuordnung von spezifischen tRNA-Isoacceptoren zu Fraktionen 70 bis 80 (Abb. 16 C) wurde durch Heranziehung der unter 3.2. sowie 3.3.1. dargestellten Ergebnisse ermöglicht. Weiterhin wurde eine in vitro ^{14}C -CH₃-markierte PA-tRNA mit ^3H -Leucin einerseits und mit ^3H -Phenylalanin andererseits acyliert und anschließend chromatographiert.

Nach diesen Ergebnissen werden folgende spezifischen tRNAs

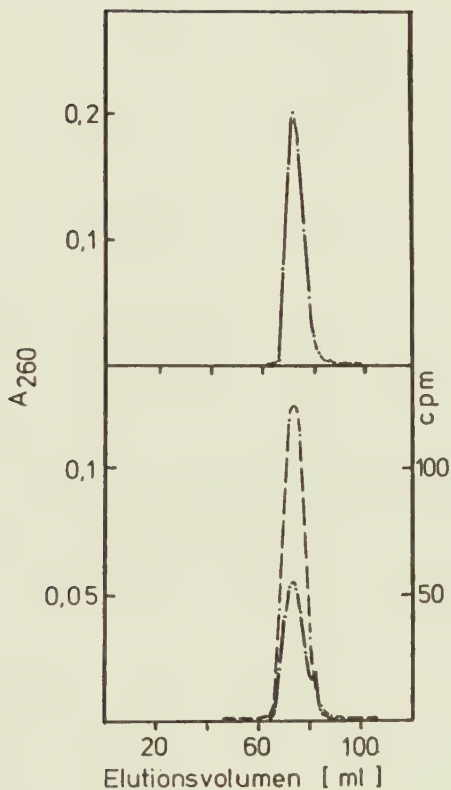


Abb. 18: Bestimmung der Größe der RNA von Fraktion 70 - 80 (Abb. 16 C) an Ultrogel AcA 34.
oben: Eichung der Säule mit tRNA
unten: Die Nucleinsäuren aus den Fraktionen 70 - 80 (Abb. 16 C) wurden zurückge-
wonnen und an derselben Ultrogelsäule chromatographiert.

• — — — A₂₆₀ — — — cpm

in den Fraktionen 70 bis 80 (Abb. 16 C) eluiert (Abb. 19):

tRNA^{Ala}

tRNA^{Arg}_{II}

tRNA^{His}

tRNA^{Leu}_{II}

tRNA^{Thr}_{IV}

tRNA^{Trp}.

3.4.7. Basenanalyse der RNA aus den Fraktionen 70 bis 80 (Abb. 16 C)

Nach dem Versuch der Zuordnung von spezifischen tRNAs zu den Fraktionen 70 bis 80 wurde untersucht, welche radioaktiv markierten Basen hierin enthalten sind.

Aus den Fraktionen 70 bis 80 (Abb. 16 C) wurde die tRNA zurückgewonnen und anschließend mit Perchlorsäure hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde nach Entsalzung über Kohle zweidimensional dünnenschichtchromatographisch aufgetrennt. Die methylierten Basen wurden durch Autoradiographie aufgefunden. Zur quantitativen Auswertung wurden die Flecken auf den Dünnschichtplatten ausgekratzt. Die Basen wurden durch 0,2 ml 0,01 N HCl aus der Cellulose herausgelöst, und nach Zugabe von 10 ml Dioxan-Scintillator wurde die Radioaktivität im Scintillationszähler bestimmt.

Wie durch Markierung wachsender Zellen mit radioaktivem Methionin gezeigt wurde (Arnold und Kersten, 1973), enthält Gesamt-tRNA aus *B. subtilis* zahlreiche SAM-abhängig gebildete methylierte Basen, von denen einige den weitaus größten relativen Anteil bilden (Tab. 5, letzte Spalte). Dies sind vor allem 1- und 7-Methylguanin, 1-Methyladenin und 2-Methyladenin.

Die quantitative Analyse der methylierten Basen der RNA aus den Fraktionen 70 bis 80 wird in Tabelle 5 mit dem Ergebnis einer gleichartigen Analyse von Gesamt-PA-tRNA verglichen. Als methylierte Basen werden zu mehr als 80 % 1- und 7-Methylguanin gefunden.

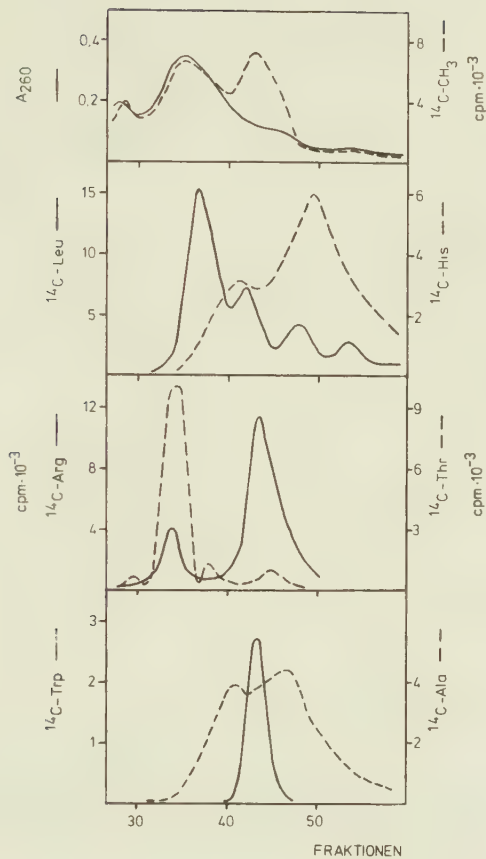


Abb. 19: Zuordnung von tRNA-Isoacceptoren zu Fraktion 70 - 80 (Abb. 16 C)
 oben: säurefällbare Radioaktivität einer homolog, ^{14}C -SAM-abhängig methylierten tRNA aus mit Pactamycin behandeltem *B. subtilis*. Diese Chromatographie erfolgte unter Standardbedingungen.
 Die anderen Elutionsprofile wurden bei Chromatographien von aminoacylierten tRNAs unter denselben Bedingungen erhalten (vgl. 3.2.).

Tab.5: Relative Verteilung der methylierten Basen von homolog methylierter PA-tRNA und in vivo methylierter Kontroll-tRNA

Verbindung	Prozent der Gesamtradioaktivität in Methylgruppen		
	(Abb.16, Fr.70-80)	Gesamt-PA-tRNA ^{a)}	Kontroll-tRNA in vivo ^{a)}
1-Methylguanin } 7-Methylguanin }	84,1	71,0	43,8
2-Methylguanin	5,6	3,6	4,9
1-Methyladenin	5,4	1,0	22,8
2-Methyladenin	1,6	3,5	13,0
6-Methyladenin	---	---	4,6
"p"	3,4	17,5	3,0
andere	---	4,0	7,9

a) aus Arnold (1973)

3.5. Biosynthese von tRNA^{Phe}

In früheren Abschnitten dieser Arbeit wurde dargelegt, daß

- i) nach langsamem Wachstum der Bakterien die Acceptoraktivität für Phenylalanin zu fast 100 % in Form eines einzigen Isoacceptors von RPC-5-Säulen eluiert wird (Abschnitt 3.3.2.; Abb. 13);
- ii) nach schnellem Wachstum der Bakterien zusätzliche tRNA^{Phe}-Isoacceptoren gefunden werden, die bei niedrigerer Kochsalzkonzentration eluiert werden (Abschnitt 3.3.2.; Abb. 13);
- iii) der Anteil der zusätzlichen Isoacceptoren durch

Pactamycinbehandlung der wachsenden Keime nochmals erhöht werden kann (Abschnitt 3.3.1.2.; Abb. 9).

In allen drei Fällen wurden die Keime, aus denen die dann untersuchten tRNAs isoliert wurden, in der stationären Phase geerntet.

Diese Ergebnisse wurden als Grundlage für die genauere Analyse des Auftretens, des relativen Anteils und der Natur der einzelnen phenylalaninspezifischen tRNA-Isoacceptoren verwendet. Folgende Fragen wurden gestellt:

Ändert sich die Verteilung der tRNA^{Phe}-Isoacceptoren mit der Wachstumsphase, bei der die Bakterien geerntet werden?

Ändert sich die Verteilung der tRNA^{Phe}-Isoacceptoren mit der Wachstumsgeschwindigkeit, mit der die Bakterien wachsen?

Sind die früh eluierten tRNA^{Phe}-Isoacceptoren untermodifizierte Formen der reifen, am Ende des RPC-5-Chromatogramms eluierten tRNA^{Phe}?

3.5.1. Verteilung der tRNA^{Phe}-Isoacceptoren in Abhängigkeit von der Wachstumsphase

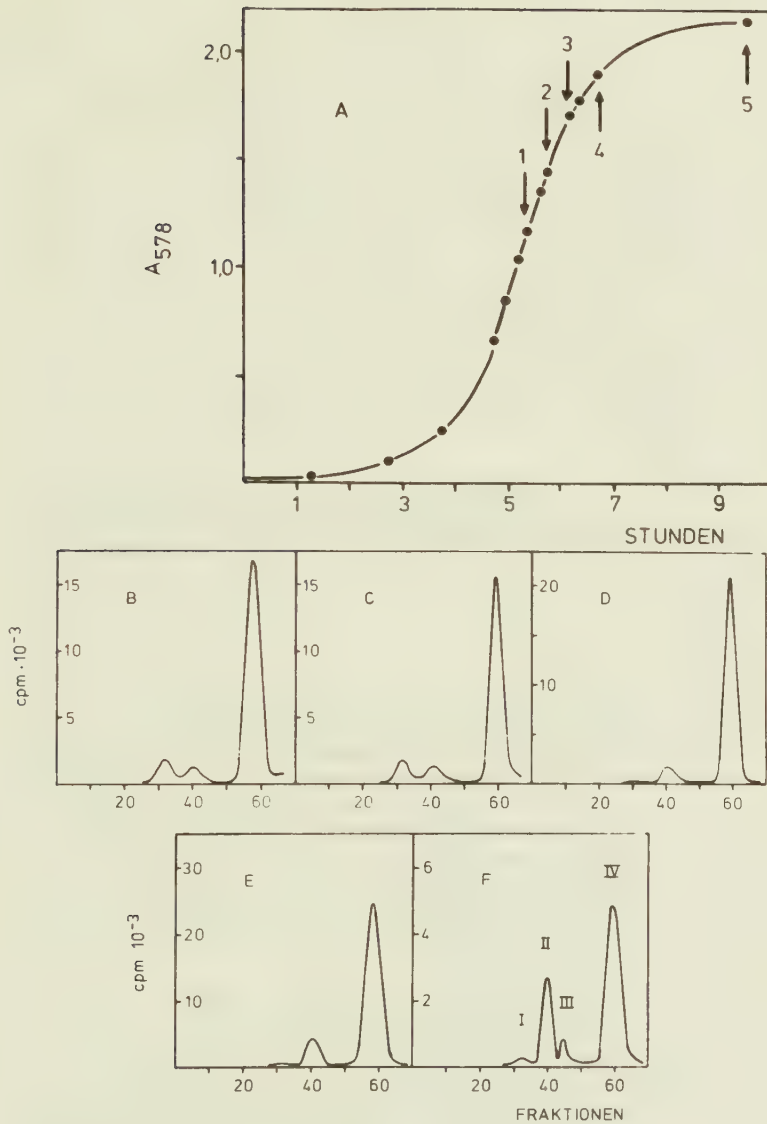
1 l Nakada-Nährmedium wurde mit 20 ml einer Übernachtkultur von *B. subtilis* inokuliert und im New Brunswick Gyrotary Shaker bei 250 Upm inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden der Kultur je 100 ml entnommen, in Eiswasser abgekühlt und zentrifugiert. Die Wachstumskurve mit der genauen Kennzeichnung der Zeitpunkte, zu denen Proben entnommen wurden, ist in Abb. 20 A dargestellt. Aus den Bakterienpopulationen wurde jeweils die Gesamt-tRNA isoliert, die nach Acylierung mit ¹⁴C-Phenylalanin auf die Verteilung der tRNA^{Phe}-Isoacceptoren durch Chromatographie an RPC-5 analysiert wurden (Abb. 20 B - F). Die Acceptoraktivitäten aller Präparationen für Phenylalanin waren

gleich. Die quantitative Auswertung erlaubt folgende Aussagen (zur Verdeutlichung vgl. Abb. 20 G):

- i) Zu allen untersuchten Zeitpunkten sind früh eluierende tRNA^{Phe} -Isoacceptoren vorhanden.
- ii) Der Anteil des zuerst eluierten Isoacceptors ($\text{tRNA}_{\text{I}}^{\text{Phe}}$; Gipfelfraktion: Fr. 32) beträgt in der log-Phase zwischen 7 und 10 %, fällt innerhalb sehr kurzer Zeit auf weniger als 2 % ab und nimmt erst in der stationären Phase geringfügig zu.
- iii) Der Anteil des mit Gipfelfraktion 40 eluierten Isoacceptors ($\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Phe}}$) nimmt im beobachteten Zeitraum durchgehend von 7 auf 25 % zu.
- iv) Der bei Fraktion 45 eluierende Isoacceptor ($\text{tRNA}_{\text{III}}^{\text{Phe}}$) wird nur in der stationären Phase in signifikantem Ausmaß beobachtet (etwa 6 %).
- v) Der Anteil des zuletzt eluierenden Isoacceptors ($\text{tRNA}_{\text{IV}}^{\text{Phe}}$; Gipfelfraktion: Fr. 59) beträgt in der log-Phase etwa 80 %, steigt kurzfristig an (zeitgleich mit dem Abfall von $\text{tRNA}_{\text{I}}^{\text{Phe}}$) und fällt dann stetig ab bis auf lediglich 65 %.

Ergänzend hierzu wurden mit zwei weiteren, separaten tRNA-Präparationen aus log-Phase-Keimen (entsprechend Punkt 1 und 2 der Wachstumskurve in Abb. 20) relative Anteile an $\text{tRNA}_{\text{I}}^{\text{Phe}}$ von 9,4 und 8,0 % sowie 10,1 und 11,8 % für $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Phe}}$ erhalten.

Weiterhin wurden für zahlreiche tRNA-Präparationen, die aus Keimen isoliert wurden, deren Ernte-Zeitpunkt etwa bei Punkt 5 der in Abb. 20 gezeigten Wachstumskurve lag, relative Anteile an $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Phe}}$ von durchschnittlich 20 % ermittelt.



Legende: s. nächste Seite

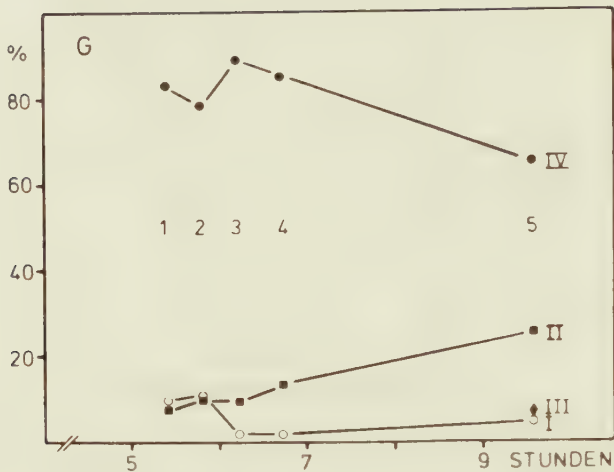


Abb. 20: Abhängigkeit der Verteilung von tRNA^{Phe}-Isoacceptoren von der Wachstumsphase

A: Wachstumskurve von *B. subtilis* W 23 in Glucose-Salz-Medium unter guten Belüftungsbedingungen. Die Pfeile geben die Zeitpunkte an, an denen Teilvolumen der Kultur entnommen wurden.

B: ¹⁴C-Phe-tRNAs^{Phe} aus Keimen, die an Punkt 1 entnommen wurden.

C: ¹⁴C-Phe-tRNAs^{Phe} aus Keimen, die an Punkt 2 entnommen wurden

D: ¹⁴C-Phe-tRNAs^{Phe} aus Keimen, die an Punkt 3 entnommen wurden

E: ¹⁴C-Phe-tRNAs^{Phe} aus Keimen, die an Punkt 4 entnommen wurden.

F: ¹⁴C-Phe-tRNAs^{Phe} aus Keimen, die an Punkt 5 entnommen wurden.

G: Relative Anteile der einzelnen tRNA^{Phe}-Isoacceptoren in % der gesamten säurefällbaren Radioaktivität. Die Werte wurden aus den von B - F angegebenen RPC-5-Elutionsprofilen ermittelt.

Chromatographiebedingungen: Standardsäule Phe/Tyr

3.5.2. Verteilung der tRNA^{Phe}-Isoacceptoren in Abhängigkeit von der Wachstumsgeschwindigkeit

Bereits in Abschnitt 3.3.2. wurde dargestellt, daß die früh eluierten tRNA^{Phe}-Isoacceptoren dann *n i c h t* auftreten, wenn die Zellen mit langsamer Geschwindigkeit wachsen. Genauere Untersuchungen zeigen, daß sowohl in der log-Phase (Abb. 21) als auch in der stationären Phase (Abb. 21 B) der relative Anteil der früh eluierten tRNAs^{Phe} unter 2 % bleibt. Um auch kleinste Mengen zu erfassen, wurde die spezifische Aktivität des radioaktiven Phenylalanins so hoch gewählt, daß ein relativer Anteil eines Isoacceptors von 0,5 % erfaßt worden wäre.

Zumindest einer der früh eluierten tRNA^{Phe}-Isoacceptoren kann jedoch dann wieder beobachtet werden, wenn eine langsam gewachsene Kultur ab Ende der log-Phase unter starker Belüftung weiter inkubiert wird (Abb. 21 C). Hier ist der Anteil an tRNA^{Phe}_{II} gegenüber der Kontrolle um den Faktor 5 erhöht.

Auch bei langsamem Wachstum führt die Zugabe von Pactamycin in der log-Phase zu einer Anhäufung von tRNA^{Phe}_{II} (Abb. 21 D). Damit werden die früheren Beobachtungen gestützt (vgl. 3.3.2.), daß Pactamycin eine Erhöhung des relativen Anteils der früh eluierten tRNAs^{Phe} bewirkt.

Wird *B. subtilis* in Maximalmedium gezüchtet und in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet, so gleicht das Elutionsprofil der tRNA^{Phe}-Isoacceptoren dem in Abb. 21 A angegebenen.

3.5.3. In vivo Umwandlung der früh eluierten tRNA^{Phe}-Isoacceptoren in reife tRNA^{Phe}

Die Frage, ob die früh eluierten phenylalaninspezifischen tRNAs untermodifizierte Formen der reifen tRNA^{Phe} sind, kann auf zwei Wegen bearbeitet werden:

- i) Isolierung aller tRNA^{Phe}-Isoacceptoren in reiner Form, anschließend Basenanalyse sowie enzymatische Spaltung in Oligonucleotide, deren Auftrennung, Analyse ihrer Verteilung und Bestimmung ihrer Zusammensetzung (direkter Beweis);

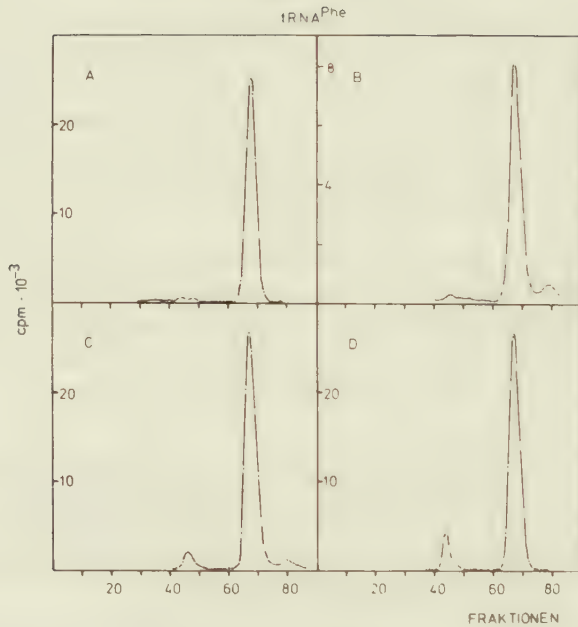


Abb. 21: RPC-5-Elutionsprofile von ^{14}C -Phe- $tRNAs^{Phe}$

- A: aus langsam gewachsenen Keimen, Erntezeitpunkt: log-Phase
- B: aus langsam gewachsenen Keimen, Erntezeitpunkt: stationäre Phase
- C: aus Keimen, die bis zum Ende der log-Phase langsam und anschließend unter starker Belüftung weiter inkubiert wurden
- D: aus Keimen, die langsam gezüchtet und ab Mitte der log-Phase mit Pactamycin behandelt wurden.

Chromatographiebedingungen: Standardsäule

- ii) Schaffung von Wachstumsbedingungen, unter denen die früh eluierten tRNA^{Phe} -Isoacceptoren in deutlich meßbarem Ausmaß vorhanden und die für die Modifizierung von tRNAs verantwortlichen Enzyme exprimiert sind. Unter diesen Bedingungen sollte nach Zugabe eines RNA-Synthese-Hemmstoffs in den Zellen eine Umwandlung untermodifizierter Formen in reife tRNA^{Phe} stattfinden (indirekter Beweis).

Der erste Weg wurde nicht gewählt, da er die Züchtung einer großen Menge Bakterien (0,5 - 1 kg), hieraus die Präparation von Gesamt-tRNA und schließlich die zeitraubende und schwierige Präparation der nur in relativ geringen Mengen vorkommenden früh eluierenden tRNA^{Phe} -Isoacceptoren beinhaltet. Stattdessen wurde eine Antwort auf dem zweiten Wege, der die gleichzeitige Beobachtung aller untermodifizierten Formen ermöglicht, durch zwei verschiedenen gestaltete Experimente gesucht. Als RNA-Synthese-Hemmstoff wurde Rifampicin gewählt.

Im ersten Experiment wurde eine 1 l-Kultur nach Erreichen einer $A_{578} = 0,7$ in drei Teile geteilt. Der erste Teil wurde sofort geerntet (Kontrolle 1). Teil 2 und 3 wurden weiter inkubiert, wobei der Teilkultur Nr. 3 $50 \mu\text{g/ml}$ Rifampicin zugesetzt wurden. Nach 20 min wurden die Bakterien aus den Kulturen 2 (Kontrolle 2) und 3 durch Zentrifugation geerntet. Aus den drei erhaltenen Bakterienniederschlägen wurde jeweils Gesamt-tRNA isoliert und die Verteilung der Phenylalanin-Acceptoraktivität an RPC-5 analysiert (Abb. 22).

Obwohl auch in der Kontrolle 2 eine Abnahme des relativen Anteils von $\text{tRNA}_I^{\text{Phe}}$ und $\text{tRNA}_{II}^{\text{Phe}}$ gegenüber der Kontrolle 1 zu beobachten ist, so ist diese Abnahme in der tRNA aus Rifampicin behandelten Keimen viel drastischer. $\text{tRNA}_I^{\text{Phe}}$ und $\text{tRNA}_{II}^{\text{Phe}}$ sind in ihrem relativen Anteil an der Gesamtacceptoraktivität für Phenylalanin um 65 % bzw. 61 % reduziert. Da die Acceptoraktivitäten der eingesetzten tRNAs

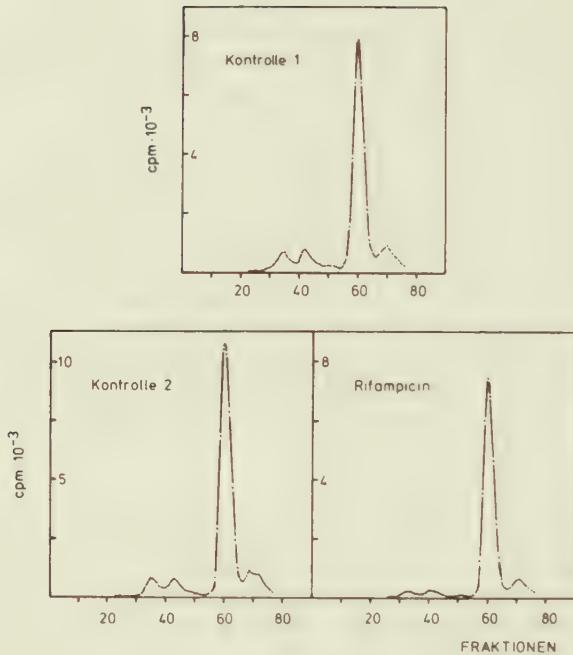
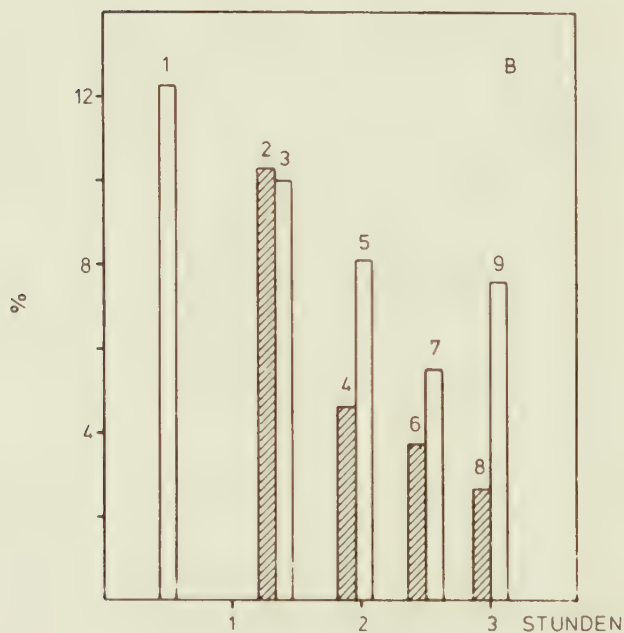
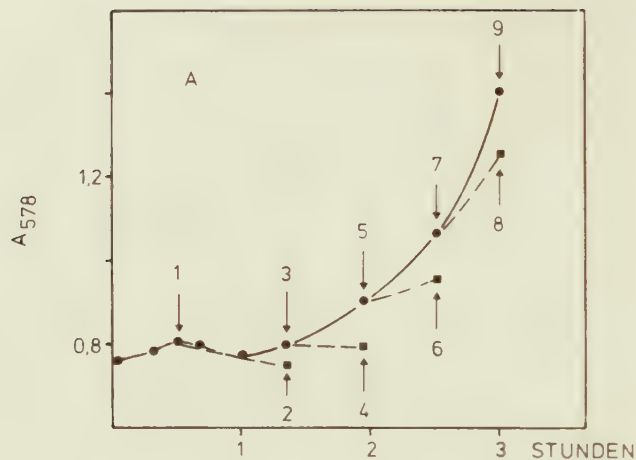


Abb. 22: "in vivo" Umwandlung von untermodifizierten Formen in reife tRNA^{Phe} in *Bacillus subtilis*. Elutionsprofile von ^{14}C -Phe-tRNAs^{Phe} an RPC-5. Der Aufbau des Experiments ist im Text beschrieben. Chromatographiebedingungen: Standardsäule Phe/Tyr

für Phenylalanin gleich waren, kann die beobachtete Abnahme des Anteils von $\text{tRNA}_{\text{I}}^{\text{Phe}}$ und $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Phe}}$ nicht durch selektive enzymatische Hydrolyse der früh eluierten Formen erfolgt sein. Sie kann nur dahingehend interpretiert werden, daß sie in Abwesenheit von de novo RNA-Synthese durch modifizierende Enzyme in die reife $\text{tRNA}_{\text{I}}^{\text{Phe}}$, $\text{tRNA}_{\text{IV}}^{\text{Phe}}$, überführt worden sind. Um diese Interpretation abzusichern, wurde eine in vivo Umwandlung der früh eluierten Formen nochmals in einem anders gestalteten Experiment untersucht. Bakterien einer unter Bedingungen schnellen Wachstums in die stationäre Phase gezüchteten Kultur wurden geerntet, in frischem Medium aufgenommen und bei 37°C inkubiert. Zu mehreren Zeitpunkten während der Anwuchsphase wurden kleine Volumina (100 ml) entnommen und geerntet (Kontrollen), während weitere Aliquote $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ Rifampicin erhielten und bis zur nächsten Kontrollentnahme weiter inkubiert wurden. Abb. 23 A verdeutlicht den Versuchsaufbau. Aus den verschiedenen Bakterienpopulationen (5 Kontrollen, viermal aus mit Rifampicin behandelten Kulturen) wurde separat Gesamt-tRNA präpariert und jeweils nach Acylierung mit radioaktivem Phenylalanin die Verteilung der tRNA^{Phe} -Isoacceptoren an RPC-5 analysiert (Abb. 23 C - L).

Die quantitative Auswertung zeigt (vgl. Abb. 23 B):

- i) Hemmung der RNA-Synthese durch Rifampicinzugabe an den Punkten 3, 5 und 7 führt zu einer deutlichen Abnahme des früh eluierten Isoacceptors ($\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Phe}}$). Die Abnahme beträgt 53,5 % (3 $\rightarrow$ 4), 53,4 % (5 $\rightarrow$ 6) bzw. 51,0 % (7 $\rightarrow$ 8).
- ii) In den Kontrollen nimmt der Anteil von $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Phe}}$ von 12,1 % (1) über 10,0 % (3) und 8,1 % (5) auf 5,6 % (7) ab. Die Abnahmen betragen 18,6 % (1 $\rightarrow$ 3), 18,4 % (3 $\rightarrow$ 5) und 31,9 % (5 $\rightarrow$ 7) und liegen damit deutlich unterhalb der Werte, die in Anwesenheit von Rifampicin erreicht werden.



Legende: s. nächste Seite

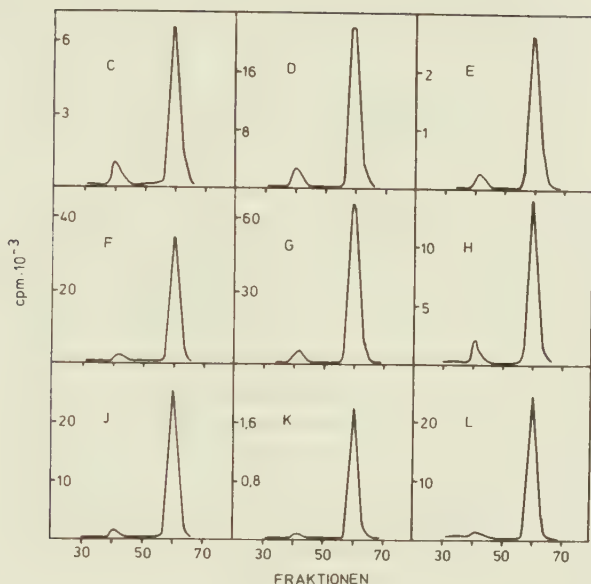


Abb. 23: "in vivo"-Umwandlung untermodifizierter tRNA^{Phe}

A: Wachstumskurve. Die Pfeile bezeichnen die Zeitpunkte, zu denen Bakterien geerntet wurden, um die Verteilung der phenylalaninspezifischen tRNA-Isoacceptoren zu untersuchen.

ungerade Zahlen: Entnahme aus der unbehandelten Kultur

gerade Zahlen: Entnahme aus mit Rifampicin behandelten Kulturen

B: Relative Anteile von tRNA^{Phe}_{II} an den in A angegebenen Zeitpunkten.

offene Säulen: Kontrollen

schraffiert: Rifampicin behandelte Kulturen

C - L: RPC-5-Elutionsprofile der phenylalaninspezifischen tRNAs aus den an den Punkten 1 - 9 geernteten Bakterien.

C = 1, D = 3, E = 5, F = 7, G = 9 (Kontrollen)

H = 2, I = 4, K = 6, L = 8 (Rifampicin behandelt)

Chromatographiebedingungen: Standardsäule Phe/Tyr

- iii) Der Anteil von $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Phe}}$ nimmt in den 30 min zwischen Kontrollentnahmen 7 und 9 um 38 % zu, während in derselben Zeit unter Rifampicineinwirkung der Anteil an $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Phe}}$ um 51 % abnimmt.
- iv) Zwischen den Entnahmen 1 und 2 nimmt der Anteil an $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Phe}}$ unter Rifampicineinwirkung ab, diese Abnahme ist jedoch nicht stärker als in der Kontrolle (1 $\rightarrow$ 3).

Diese Ergebnisse - zusammen mit denen des Experiments, das in der logarithmischen Phase durchgeführt wurde - lassen nur die Interpretation zu, daß bei Hemmung der RNA-Synthese durch Rifampicin eine Umwandlung von $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Phe}}$ in reife $\text{tRNA}_{\text{IV}}^{\text{Phe}}$, $\text{tRNA}_{\text{IV}}^{\text{Phe}}$, erfolgt. Bei heterogenetischem Ursprung der $\text{tRNA}_{\text{IV}}^{\text{Phe}}$ -Isoacceptoren hätte eine derartige starke Abnahme der früh eluierten $\text{tRNAs}^{\text{Phe}}$ nicht beobachtet werden dürfen. Eine selektive enzymatische Hydrolyse der früh eluierten Formen kann ausgeschlossen werden, da in allen Fällen die Acceptoraktivität für Phenylalanin der tRNAs aus mit Rifampicin behandelten Keimen zumindest genauso hoch wie die der Kontroll-tRNAs war. Das Ergebnis der Entnahmen 1, 2 und 3 wird dahingehend gedeutet, daß zum Zeitpunkt 1 das oder die modifizierenden Enzyme nicht vorhanden und/oder stark gehemmt waren. Diese Deutung wird dadurch erhärtet, daß das Inoculum der untersuchten Kultur aus Keimen der stationären Phase bestand. In der stationären Phase wird nach den Ergebnissen von 3.5.1. wenig $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Phe}}$ in $\text{tRNA}_{\text{IV}}^{\text{Phe}}$ umgewandelt, so daß es zu einer Anhäufung von $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Phe}}$ kommt.

3.6. Biosynthese von tRNA^{Tyr}

In gleicher Weise wie für tRNA^{Phe} wurde die Abhängigkeit des Auftretens von tRNA^{Tyr}_I und tRNA^{Tyr}_{II} von verschiedenen physiologischen Bedingungen des Zellwachstums untersucht. Meistens wurden hierfür dieselben Gesamt-tRNA-Präparationen benutzt, die auf ihre Verteilung an tRNA^{Phe}-Isoacceptoren untersucht waren. Dabei galt es zunächst, ein bei der Präparation von Gesamt-tRNA zufällig auftretendes Artefakt auszuschließen, das eine quantitative Ermittlung der relativen Anteile der beiden tRNA^{Tyr}-Isoacceptoren verhinderte.

3.6.1. Aggregatbildung der Tyrosin-spezifischen tRNAs

Bei der Chromatographie von ¹⁴C-Tyrosin-tRNAs^{Tyr} an RPC-5 wurde in einigen Fällen festgestellt, daß sich ein erheblicher Teil der Radioaktivität nicht mit den angewendeten Kochsalzgradienten, sondern erst mit 2 M NaCl-Puffer eluieren ließ (Abb. 24 A). Aus der zur Ablösung erforderlichen hohen Kochsalzkonzentration wurde geschlossen, daß es sich um Material handelt, das höhermolekular als tRNA ist. Im weiteren wurde beobachtet, daß dieses hochmolekulare Material sowohl aus tRNA^{Tyr}_I als auch aus tRNA^{Tyr}_{II} entstehen kann (vgl. hierzu Abschnitt 3.8.3.).

Eine quantitative Ermittlung des relativen Anteils der tRNA^{Tyr}-Isoacceptoren an der gesamten Acceptoraktivität für Tyrosin kann dann jedoch nicht vorgenommen werden, wenn ein Teil dieser tRNAs in Form von Aggregaten eluiert wird, da hierin nicht zwischen Anteilen von tRNA^{Tyr}_I und tRNA^{Tyr}_{II} differenziert werden kann. Es wurden deshalb Wege gesucht, vorhandene Aggregate vor der Chromatographie zu dissoziieren.

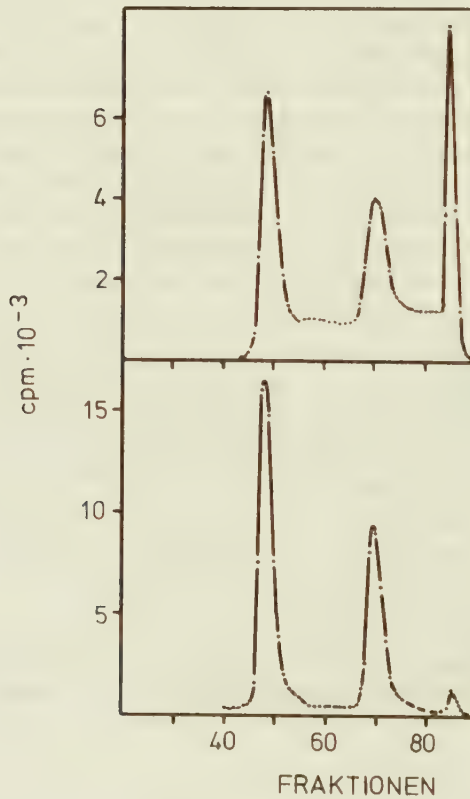
Yang, Söll und Crothers (1972) beschreiben in einer genauen Charakterisierung von tRNA^{Tyr}-Dimeren aus E. coli die nahezu vollständige Dissoziation dieser Dimeren durch Erhitzen von verdünnten, Mg²⁺-haltigen Lösungen auf Temperaturen über

Abb. 24: Dissoziation von Aggregaten der Tyrosin-spezifischen tRNAs

A: RPC-5-Elutionsprofil von ^{14}C -Tyr-tRNAs^{Tyr}, die Probe wurde vor der Aminoacylierung nicht erhitzt.

B: RPC-5-Elutionsprofil von ^{14}C -Tyr-tRNAs^{Tyr}, die Probe wurde vor der Aminoacylierung für 10 min auf 70° erhitzt.

Der letzte Radioaktivitätsgipfel wurde mit 2,0 M NaCl eluiert. Die Chromatographien wurden an der Standardsäule durchgeführt.



65° und anschließende schnelle Abkühlung. Werden diese Bedingungen auf *B. subtilis* tRNA angewendet, so dissoziieren die Aggregate nahezu vollständig. Während vor dem Erhitzen etwa 30 % der Tyrosyl-tRNAs als Aggregat eluiert wurden (Abb. 24 A), sinkt dieser Anteil durch das Erhitzen (10 min, 70°C) auf 2,5 % (Abb. 24 B). Das Verhältnis $\text{tRNA}_{\text{I}}^{\text{Tyr}}/\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Tyr}}$, das vor Erhitzen scheinbar bei 52 zu 48 lag, beträgt nach der Dissoziation 62/38. Die Acceptoraktivität der Probe (ausgedrückt in pmol Tyr/A₂₆₀) wird durch das kurzfristige Erhitzen nicht beeinträchtigt.

Bei den folgenden geschilderten Experimenten wurde daher immer dann, wenn ein hoher Anteil an Aggregatbildung zu beobachten war, die Chromatographie wiederholt, wobei die tRNA vor der Aminoacylierung auf 70°C erhitzt und in Eiswasser abgekühlt wurden.

3.6.2. Die Synthese von Tyrosin-spezifischen tRNAs in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Medien, der Wachstumsphase und der Wachstumsgeschwindigkeit.

Die Abhängigkeit der relativen Anteile von $\text{tRNA}_{\text{I}}^{\text{Tyr}}$ und $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Tyr}}$ von der Wachstumsphase ist eingehend untersucht für *B. subtilis* W 168 (Arceneaux und Sueoka, 1969) und *B. subtilis* 168 trp C2 (Vold, 1973b). In beiden Fällen wurden die Zellen in Maximalmedium (Penassay broth bzw. Trypton-Hefeextrakt-Medium) gezüchtet.

Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Untersuchungen zeigen, daß auch in *B. subtilis* W 23, gezüchtet in Trypton-Hefeextrakt-Medium, in der log-Phase der relative Anteil von $\text{tRNA}_{\text{I}}^{\text{Tyr}}$ zugunsten des relativen Anteils von $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Tyr}}$ abnimmt (ohne Abb.). Die Literaturbefunde konnten durch diese Untersuchungen an *B. subtilis* W 23 bestätigt werden.

Wird *B. subtilis* W 23 in einem Glucose-Salz-Medium unter heftiger Belüftung gezüchtet, so ergibt sich keine Abhän-

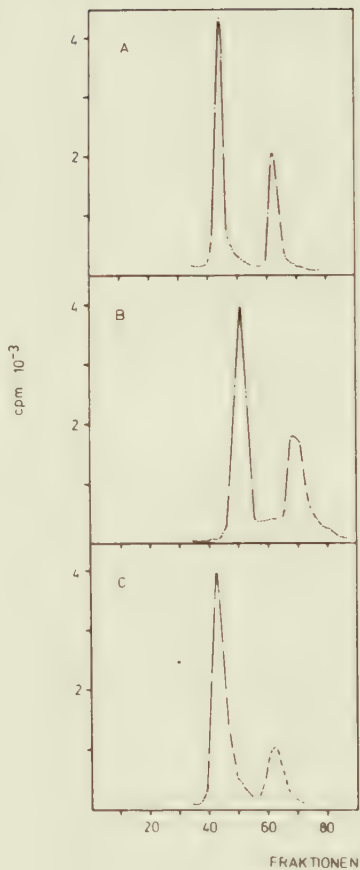
Abb. 25: RPC-5-Elutionsprofile von ^{14}C -Tyr-tRNAs^{Tyr}
nach schnellem Wachstum der Keime

A: Erntezeitpunkt: log-Phase

B: Erntezeitpunkt: frühe stationäre Phase

C: Erntezeitpunkt: späte stationäre Phase

Chromatographiebedingungen: Standardsäule (B) bzw.
Standardsäule Phe/Tyr (A,C)



gigkeit der relativen Anteile der beiden Tyrosin-spezifischen tRNA-Isoacceptoren von der Wachstumsphase. Weder in der log-Phase (Abb. 25 A) noch in der frühen stationären (Abb. 25 B) oder späten stationären Phase (Abb. 25 C) ändert sich das Verhältnis zwischen $\text{tRNA}_I^{\text{Tyr}}$ und $\text{tRNA}_{II}^{\text{Tyr}}$ dramatisch, $\text{tRNA}_I^{\text{Tyr}}$ hat jeweils den größeren relativen Anteil.

Eine den Beobachtungen an in Maximalmedium gezüchteten Keimen ähnliche Abhängigkeit des Verhältnisses $\text{tRNA}_I^{\text{Tyr}}/\text{tRNA}_{II}^{\text{Tyr}}$ von der Wachstumsphase kann jedoch dann festgestellt werden, wenn *B. subtilis* W 23 in Glucose-Salz-Medium unter schlechten Belüftungsbedingungen gezüchtet wird (Abb. 26 A - D). Mit zunehmender Zelldichte erhöht sich der relative Anteil von $\text{tRNA}_I^{\text{Tyr}}$ auf Kosten des Anteils von $\text{tRNA}_{II}^{\text{Tyr}}$.

Die strenge Abhängigkeit des Verhältnisses $\text{tRNA}_I^{\text{Tyr}}/\text{tRNA}_{II}^{\text{Tyr}}$ von der Belüftung der Zellkultur verdeutlicht ein weiterer Versuch, bei dem eine Kultur zunächst unter schlechter Belüftung bis an das Ende der log-Phase gezüchtet wurde. Die hieraus isolierte tRNA zeigte einen relativen Anteil von 34,6 % $\text{tRNA}_I^{\text{Tyr}}$ und 65,4 % $\text{tRNA}_{II}^{\text{Tyr}}$ (Abb. 26 E). Ein Teilvolumen dieser Kultur wurde dann unter guten Belüftungsbedingungen für 140 min weiterinkubiert. Die hieraus isolierte tRNA zeigt ein Verhältnis von 62 zu 38 zwischen $\text{tRNA}_I^{\text{Tyr}}$ und $\text{tRNA}_{II}^{\text{Tyr}}$ (Abb. 26 F). In dieser Kultur haben sich demnach wiederum die Verhältnisse eingestellt, die gefunden wurden, wenn die Kultur von vornherein ausreichend belüftet wurde (vgl. Abb. 25).

Eine ähnliche Umkehrung der Verhältnisse wird gefunden, wenn die Zellen unter Bedingungen langsamen Wachstums mit Pactamycin behandelt wurden. Während vor der Zugabe des Antibiotikums beide tRNA^{Tyr} -Isoacceptoren in gleichem Anteil vorhanden waren (Abb. 26 G), findet sich nach dreistündiger Pactamycinbehandlung der Zellen wiederum ein gegenüber $\text{tRNA}_{II}^{\text{Tyr}}$ erhöhter Anteil an $\text{tRNA}_I^{\text{Tyr}}$ (Abb. 26 H).

Abb. 26: RPC-5-Elutionsprofile von ^{14}C -Tyr-tRNAs^{Tyr}

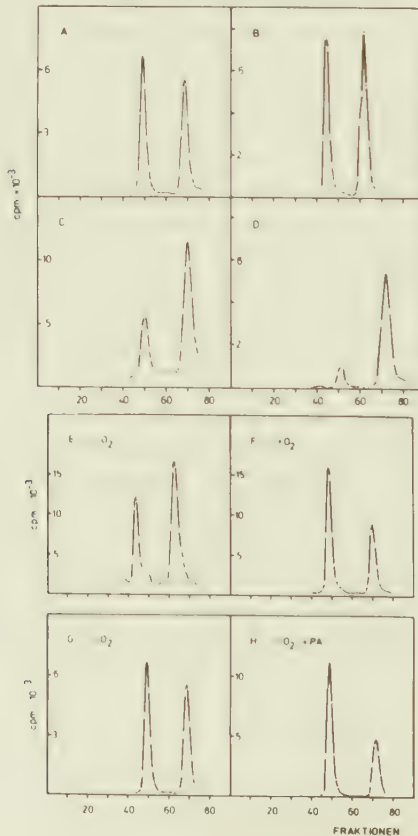
A - D: Abhängigkeit der Verteilung der tRNA^{Tyr}-Isoacceptoren von der Wachstumsphase bei langsamem Wachstum der Keime.

- A: Erntezeitpunkt: frühe log-Phase
- B: Erntezeitpunkt: späte log-Phase
- C: Erntezeitpunkt: frühe stationäre Phase
- D: Erntezeitpunkt: späte stationäre Phase

E + F: Eine Kultur wurde langsam bis in die log-Phase gezüchtet (E) und dann unter heftiger Belüftung für 140 min weiter inkubiert (F).

G + H: Eine Kultur wurde langsam bis in die log-Phase gezüchtet (G) und dann unter Beibehaltung der schlechten Sauerstoffversorgung mit Pactamycin behandelt (H).

Chromatographiebedingungen: Standardsäule Phe/Tyr für B und E, sonst Standardsäule



3.6.3. Versuche zur Umwandlung von $\text{tRNA}_{\text{I}}^{\text{Tyr}}$ in $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Tyr}}$ in wachsenden *B. subtilis*

Durch Behandlung einer wachsenden Kultur mit Rifampicin konnte gezeigt werden (vgl. 3.5.3.), daß die früh eluierten tRNA^{Phe} -Isoacceptoren untermodifizierte Formen der reifen tRNA^{Phe} sind. An denselben tRNA-Präparationen - das Ergebnis der tRNA^{Phe} -Experimente zeigt, daß modifizierende Enzyme unter den angegebenen Bedingungen aktiv waren (positive Kontrolle!) - wurde untersucht, ob auch die Tyrosinspezifischen tRNAs ineinander umgewandelt wurden.

Eine Rifampicinbehandlung einer in der log-Phase wachsenden Kultur führt *n i c h t* zu einer Umwandlung von $\text{tRNA}_{\text{I}}^{\text{Tyr}}$ in $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Tyr}}$ (Abb. 27 A, B) oder umgekehrt.

Auch in die tRNA-Präparationen, die aus anderen mit Rifampicin behandelten Kulturen gewonnen wurden (vgl. Abb. 23), waren die relativen Anteile von $\text{tRNA}_{\text{I}}^{\text{Tyr}}$ vor und nach der Rifampicinbehandlung gleich.

Es ist daher denkbar, daß $\text{tRNA}_{\text{I}}^{\text{Tyr}}$ nicht eine untermodifizierte Form von $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Tyr}}$ darstellt, sondern heterogenetischer Herkunft ist. In *E. coli* kommen zwei heterogenetische Tyrosin-spezifische tRNAs vor (Goodman et al., 1970).

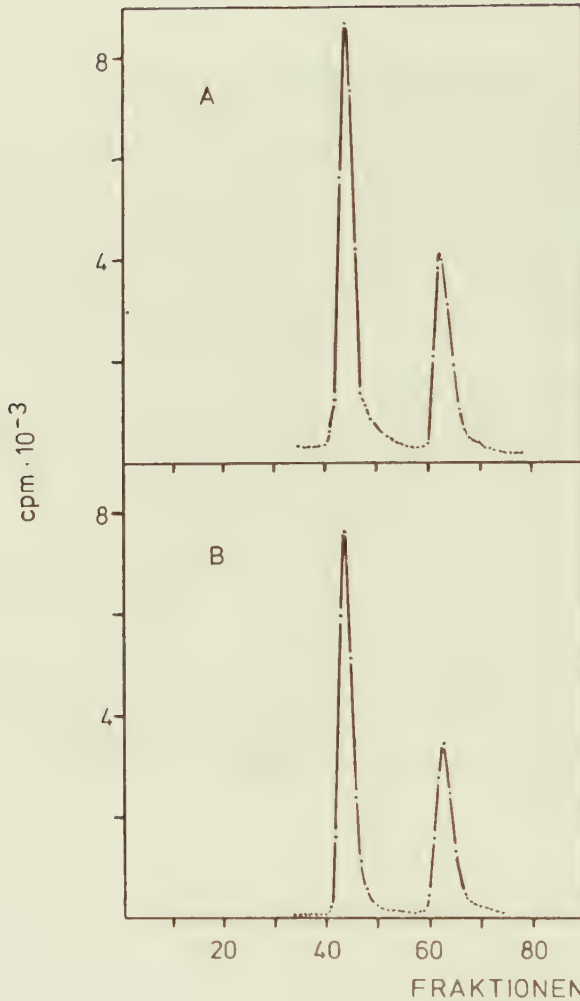


Abb. 27: Versuch zur "in vivo"-Umwandlung von $\text{tRNA}_{\text{I}}^{\text{Tyr}}$ in $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Tyr}}$

A: RPC-5-Elutionsprofil von ^{14}C -Tyr-tRNAs einer in der log-Phase geernteten Kultur

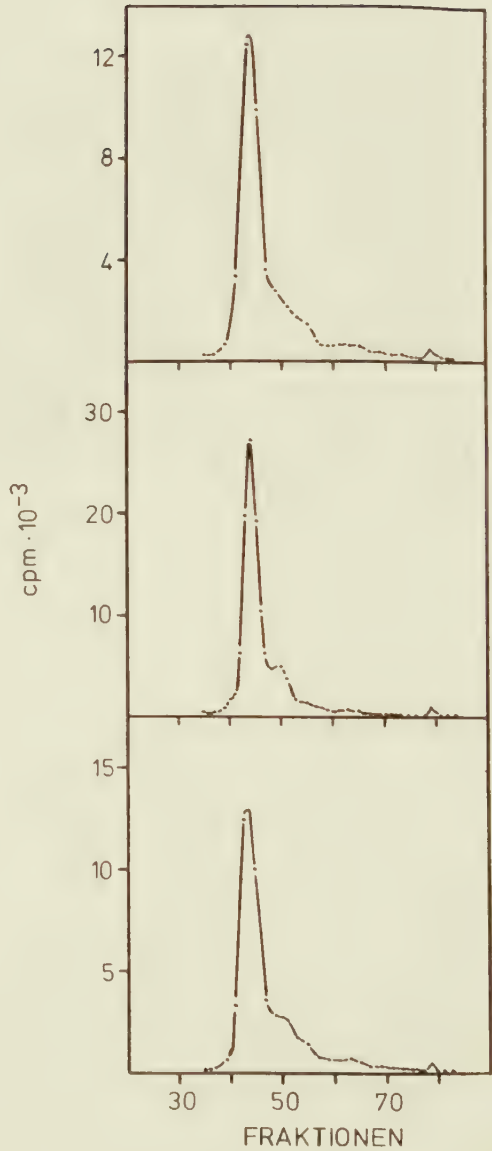
B: RPC-5-Elutionsprofil von ^{14}C -Tyr-tRNAs aus derselben Kultur, die für 20 min mit Rifampicin behandelt wurde

Chromatographiebedingungen: Standardsäule Phe / Tyr

3.6.4. $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Tyr}}$ ist nicht ein Konformationsisomeres
von $\text{tRNA}_{\text{I}}^{\text{Tyr}}$

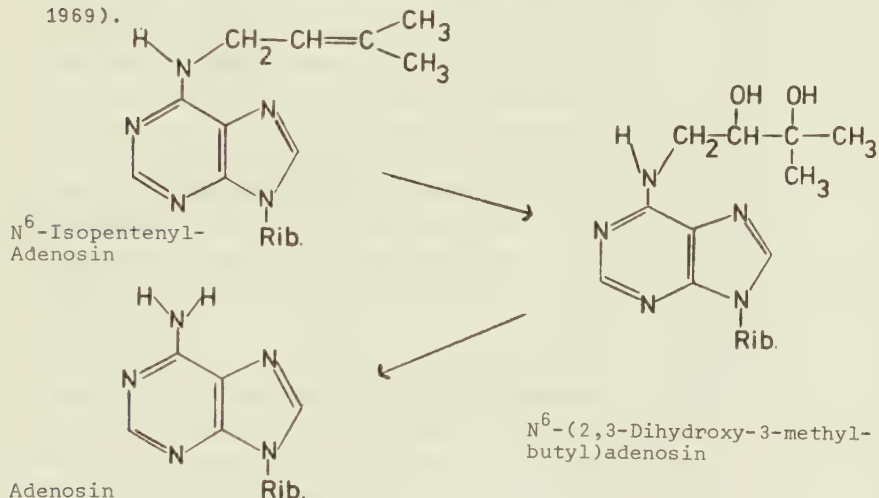
Zahlreiche Literaturbefunde weisen darauf hin, daß einige spezifische tRNAs Konformationsänderungen unterworfen sind, die sich auf das chromatographische Verhalten auswirken. Es wurde daher untersucht, ob $\text{tRNA}_{\text{I}}^{\text{Tyr}}$ durch Erhitzen auf 70°C sowohl in Abwesenheit als auch in Gegenwart von Magnesiumionen in $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Tyr}}$ überführt werden kann. Diese Bedingungen sollten zumindest eine teilweise Konformationsänderung bewirken. Die in Abb. 28 zusammengestellten Elutionsprofile besagen, daß auch nach Erhitzen die gesamte Radioaktivität an der Position von $\text{tRNA}_{\text{I}}^{\text{Tyr}}$ eluiert wird. Da die angewendeten Bedingungen in allen in der Literatur beschriebenen Fällen zu Konformationsänderungen geführt haben, wird aus den Ergebnissen geschlossen, daß $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Tyr}}$ kein Konformationsisomeres von $\text{tRNA}_{\text{I}}^{\text{Tyr}}$ ist.

Abb. 28: Versuch der Umwandlung von $\text{tRNA}_{\text{I}}^{\text{Tyr}}$ in $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Tyr}}$
RPC-5-Elutionsprofile der aminoacylierten tRNA
oben: $\text{tRNA}_{\text{I}}^{\text{Tyr}}$ ohne Wärmebehandlung
Mitte: $\text{tRNA}_{\text{I}}^{\text{Tyr}}$ wurde vor der Aminoacylierung
für 10 min in Gegenwart von 0,01 M Magnesium-
ionen auf 70° erhitzt.
unten: $\text{tRNA}_{\text{I}}^{\text{Tyr}}$ wurde vor der Aminoacylierung
für 10 min in Abwesenheit von Magnesium-
ionen auf 70° erhitzt.
Chromatographiebedingungen: Standardsäule Phe/Tyr



3.7. Reaktivität von Phenylalanin- und Tyrosin-spezifischen tRNAs gegenüber KMnO_4

Die Behandlung von tRNA mit verdünnter wäßriger Permanganatlösung führt bei den tRNA-Isoacceptoren, die einen Isopentenyladenosinrest enthalten, zur Umwandlung der Isopentenyl-Seitenketten des Adenosins, ohne die Gesamtstruktur der tRNA zu zerstören (Kline, Fittler und Hall, 1969).



Nach der Reaktion liegen 50 % in der dihydroxylierten Form und 30 % als Adenosin vor. Vor keinem anderen der in tRNA vorkommenden Haupt- und seltenen Nucleotide ist unter diesen Bedingungen eine Reaktivität gegenüber Permanganat bekannt (Hall, 1971).

Diese Reaktion wurde gewählt, um die Phenylalanin- und Tyrosin-spezifischen tRNAs auf die Anwesenheit von Isopentenylgruppen zu überprüfen. Als Probe für untermodifizierte tRNA^{Phe} und tRNA^{Tyr}_I wurde eine nach 3.8.2. angereicherte Präparation verwendet, als Probe für reife tRNA^{Phe} und tRNA^{Tyr}_{II} eine Gesamt-tRNA benutzt, deren Anteil an untermodifizierten tRNAs^{Phe} kleiner als 2 % und an tRNA^{Tyr}_I bei

nur 10 % lag. Die umgesetzten Proben wurden nach Acylierung mit ^{14}C -Phe bzw. ^{14}C -Tyr auf die Verteilung der Phenylalanin- bzw. Tyrosin-Acceptoraktivität durch Chromatographie an RPC-5 untersucht (Abb. 29).

Abb. 29 A verdeutlicht die Umsetzung von $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Phe}}$, Abb. 29 B diejenige von $\text{tRNA}_{\text{IV}}^{\text{Phe}}$. In beiden Fällen wurden etwa 80 % des untersuchten Isoacceptors umgesetzt. Sowohl aus $\text{tRNA}_{\text{IV}}^{\text{Phe}}$ als auch aus $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Phe}}$ entstehen je zwei Produkte, wobei die Produkte aus $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Phe}}$ unvollständig voneinander und von der ebenfalls vorhandenen $\text{tRNA}_{\text{I}}^{\text{Phe}}$ abgetrennt sind. Das Hauptprodukt aus $\text{tRNA}_{\text{IV}}^{\text{Phe}}$ (Gipfelfraktion: Fr. 35) ist nicht mit dem aus $\text{tRNA}_{\text{IV}}^{\text{Phe}}$ (Gipfelfraktionen: Fr. 39/40) identisch, letzteres unterscheidet sich auch von $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Phe}}$, wie durch Cochromatographie (ohne Abb.) gezeigt werden konnte. Die in geringeren Mengen entstehenden Reaktionsprodukte aus $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Phe}}$ und $\text{tRNA}_{\text{IV}}^{\text{Phe}}$ können chromatographisch nicht voneinander und von $\text{tRNA}_{\text{I}}^{\text{Phe}}$ unterschieden werden.

Die Umsetzung von $\text{tRNA}_{\text{I}}^{\text{Tyr}}$ (Abb. 29 C, Fr. 44) liefert scheinbar nur ein Reaktionsprodukt (Gipfelfraktion: Fr. 37), aus der langsam ansteigenden vorderen Flanke dieses Gipfels muß jedoch geschlossen werden, daß z w e i Produkte mit sehr geringen Unterschieden in der chromatographischen Beweglichkeit gebildet wurden.

Die Untersuchung der Permanganatreaktivität von $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Tyr}}$ wurde an einer Gesamt-tRNA untersucht, die neben $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Tyr}}$ auch $\text{tRNA}_{\text{I}}^{\text{Tyr}}$ in einem relativen Anteil von 10 % enthält. Im Elutionsprofil sind also neben $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Tyr}}$ und ihren eventuellen Reaktionsprodukten auch - in geringem Anteil - $\text{tRNA}_{\text{I}}^{\text{Tyr}}$ und ihre Reaktionsprodukte zu erwarten. Die einzelnen Gipfel (Abb. 29 D) des Elutionsprofils lassen sich wie folgt zuordnen:

Gipfelfraktion 34/35:	Nebenprodukt aus $\text{tRNA}_{\text{I}}^{\text{Tyr}}$ und $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Tyr}}$
Gipfelfraktion 37:	Hauptprodukt aus $\text{tRNA}_{\text{I}}^{\text{Tyr}}$ (vgl. Abb. 29 C)

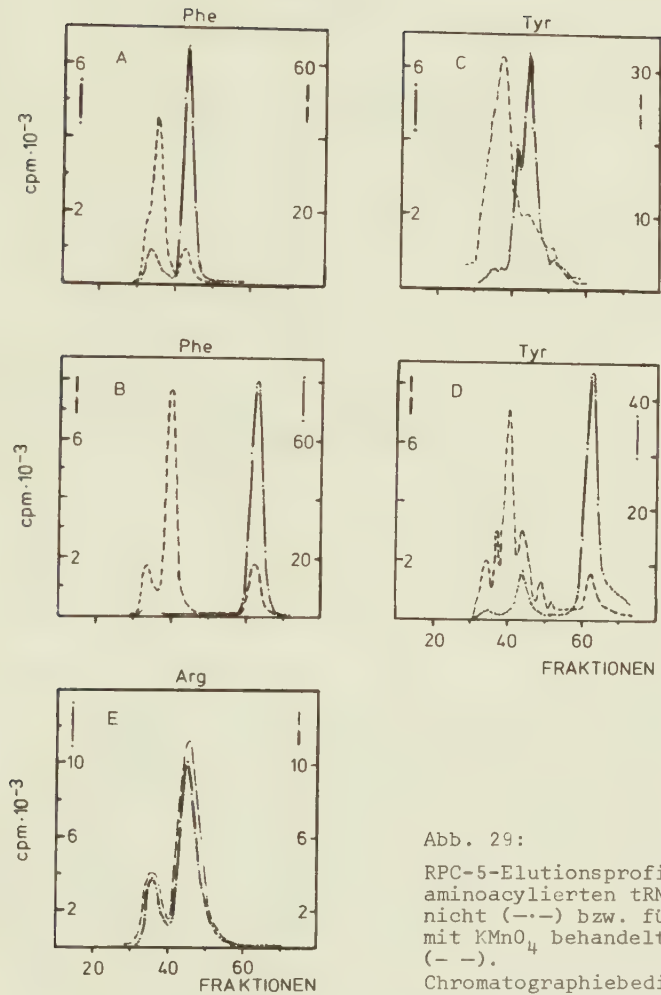


Abb. 29:

RPC-5-Elutionsprofile von aminoacylierten tRNAs, die nicht (—) bzw. für 15 min mit KMnO_4 behandelt wurden (---).

Chromatographiebedingungen: Standardsäule Phe/Tyr für A, B, C und D; Standardsäule für E

Gipfelfraktion 40: Hauptprodukt aus $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Tyr}}$
Gipfelfraktion 44: $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Tyr}}$ (nicht umgesetzt)
Gipfelfraktion 62/63: $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Tyr}}$ (nicht umgesetzt)

Damit ist eindeutig geklärt, daß sowohl $\text{tRNA}_{\text{I}}^{\text{Tyr}}$ als auch $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Tyr}}$ eine gegenüber Kaliumpermanganat reaktive Gruppe enthalten. Das Ausmaß der Umsetzung von $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Tyr}}$ - ermittelt aus der Abnahme des relativen Anteils von $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Tyr}}$ nach Permanganat-Umsetzung - beträgt 84 %; das Ausmaß der Umsetzung von $\text{tRNA}_{\text{I}}^{\text{Tyr}}$ läßt sich wegen der unvollständigen Auflösung zwischen Ausgangs- und Reaktionsprodukt nur abschätzen, es liegt in derselben Größenordnung.

Als Kontrolle und zur Überprüfung der Spezifität der Reaktion wurden die Arginin-spezifischen tRNAs nach KMnO_4 -Behandlung analysiert. tRNAs^{Arg} wurden als Beispiel für eine Familie von Isoacceptoren gewählt, deren Codon nicht mit U anfängt. Bei diesen tRNAs ist die Anwesenheit von N^6 -Isopentenyladenosin oder einem verwandten Nucleotid nicht zu erwarten (Nishimura, 1972). Das Elutionsprofil von Arg-tRNAs^{Arg} nach KMnO_4 -Behandlung (Abb. 29 E) ist nicht unterscheidbar von dem, welches für eine unbehandelte Kontrolle erhalten wurde (vgl. 3.2., Abb. 3).

Die Ergebnisse zeigen, daß sowohl $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Phe}}$ und $\text{tRNA}_{\text{IV}}^{\text{Phe}}$ als auch $\text{tRNA}_{\text{I}}^{\text{Tyr}}$ und $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Tyr}}$ eine gegenüber Permanganat reaktive Gruppe tragen. Dies ist ein indirekter Hinweis darauf, daß diese vier tRNA-Isoacceptoren N^6 -Isopentenyladenosin, ein Derivat davon oder ein sehr ähnliches Nucleotid enthalten.

Die Untermodifizierung von $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Phe}}$ gegenüber $\text{tRNA}_{\text{IV}}^{\text{Phe}}$ kann sich also nicht auf die Isopentenylgruppe beziehen; falls $\text{tRNA}_{\text{I}}^{\text{Tyr}}$ eine untermodifizierte Form von $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Tyr}}$ darstellt, so ist die fehlende Modifizierung ebenfalls eine andere Gruppierung. Diese Befunde werden in Zusammenhang mit analogen Experimenten an untermodifizierten tRNAs^{Phe} aus E.coli ausführlich diskutiert.

3.8. Isolierung spezifischer tRNAs aus *B. subtilis*

3.8.1. Versuche zur Anreicherung von tRNA^{Phe}

Zu Beginn dieser Arbeit wurde versucht, über einen früher (Raettig, 1973) vorgeschlagenen Weg tRNA^{Phe} zu isolieren.

Folgende Einzelschritte wurden durchgeführt:

Acylierung von Gesamt-tRNA mit ¹⁴C-Phe

Chromatographie an BD-Cellulose, hierbei stufenweise Elution

Aufarbeitung der radioaktiven Fraktionen unter Einhaltung von pH 4 - 5

Chromatographie dieser Fraktionen an RPC-5 bei pH 4,5

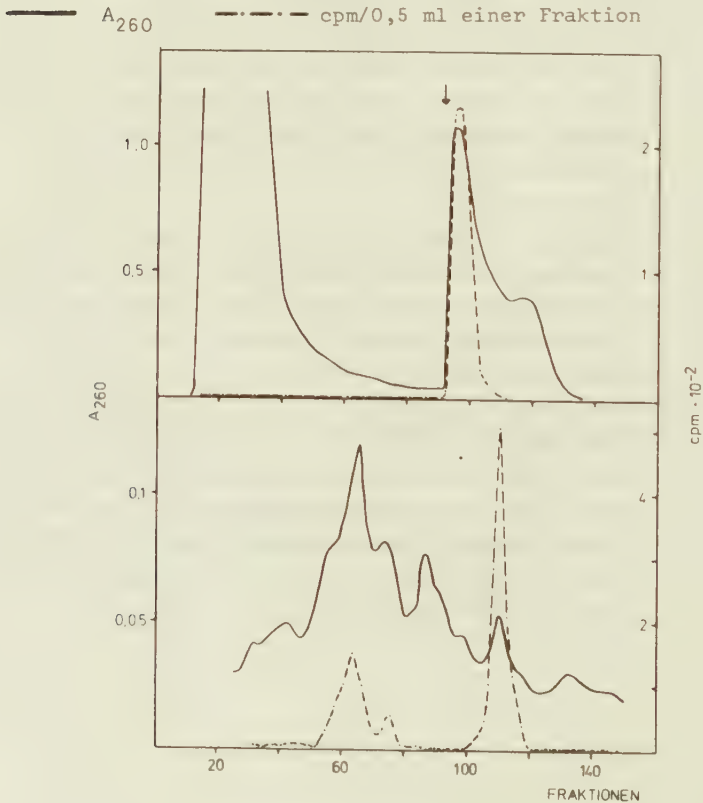
Abb. 30 faßt die Ergebnisse zusammen. Hierbei werden Vor- und Nachteil des eingeschlagenen Weges deutlich:

- i) der einleitende enzymatische Schritt läßt sich nur mit geringen Mengen Gesamt-tRNA durchführen, dadurch werden in der zweiten Chromatographie so kleine Mengen an tRNA^{Phe} erhalten, daß sie sich kaum noch aufarbeiten lassen (0,15 mg in 80 ml Säuleneluat);
- ii) die Gipfelfraktion (Fr. 110) hat zwar mit 1000 pmol/A₂₆₀ eine ausreichende Reinheit, jedoch sind die Flanken so stark mit anderen tRNAs versetzt, daß die spezifische Aktivität der vereinigten Fraktionen mit 423 pmol/A₂₆₀ niedrig ist; ein weiterer Reinigungsschritt wird notwendig, hierfür sind die erhaltenen Mengen wiederum zu gering;
- iii) die Veresterung mit radioaktivem Phenylalanin erlaubt zwar ein rasches Auffinden der phe-tRNAs in Eluat, bedarf jedoch besonderer Vorsichtsmaßnahmen während des gesamten Experiments, um eine Desacylierung zu verhindern.

Abb. 30: Versuch zur Anreicherung von tRNA^{Phe}

oben: 300 A₂₆₀ mit ¹⁴C-Phe acylierte tRNA wurden an einer BD-Cellulose-Säule chromatographiert. Säule: 3 x 28 cm Durchfluß: 105 ml/h Fraktionsgröße: 10,5 ml/6 min Die Elution erfolgte mit einem Puffer folgender Zusammensetzung: 1,6 M NaCl, 0,01 M MgAc₂, 0,05 M NaAc, pH 5,0, 0,04 % NaN₃. Ab Fr. 91 wurde mit demselben Puffer, der jedoch 30 %ig an Äthanol war, eluiert.

unten: Fraktionen 91 - 100 aus der Chromatographie an BD-Cellulose wurden eingengt und entsalzt und auf eine 2 x 45 cm RPC-5-Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten (Gesamtvolumen: 2 l) von Puffer C nach Puffer D. Durchflußrate: 95 ml/h Fraktionen: 6 min



Zusammenfassend wird festgehalten: Der beschriebene Weg ist nur dann als Methode zur Isolierung von tRNA^{Phe} durchführbar, wenn es gelingt, den enzymatischen Acylierungsschritt in großem Maßstab durchzuführen. Es ist unsinnig, 300 A₂₆₀ Gesamt-tRNA als Ausgangsmenge zu wählen. Der beschriebene Weg liefert ein Produkt, das gegenüber dem Ausgangsmaterial zwölffach an tRNA^{Phe}_{IV} angereichert ist, ein weiterer Reinigungsschritt ist jedoch unbedingt erforderlich, um saubere tRNA^{Phe} zu erhalten.

Die Darstellung von tRNA^{Phe} ist inzwischen auf anderem Wege gelungen (Raettig et al., Publikation in Vorbereitung).

3.8.2. Anreicherung untermodifizierter tRNA^{Phe}

Eine genaue Charakterisierung untermodifizierter tRNA erfordert ihre Anreicherung, insbesondere die Abtrennung vom vollständig modifizierten Molekül gleicher Aminosäurespezifität. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Anreicherung untermodifizierter tRNA^{Phe} notwendig, um ihre Reaktivität gegenüber KMnO₄ (vgl. 3.7.) zu untersuchen.

Ausgangsprodukt war eine Gesamt-tRNA, die aus Keimen isoliert wurde, die unter Bedingungen schnellen Wachstums gezüchtet und nach Erreichen der stationären Phase geerntet wurden. Unter diesen Wachstumsverhältnissen ist der Anteil der Gesamt-tRNA an untermodifizierter tRNA^{Phe} besonders hoch.

Die Fraktionierung erfolgte an BD-Cellulose (Abb. 31). Die Acceptoraktivität im Säuleneluat ist deutlich auf zwei Bereiche verteilt, von denen der erste (Fr. 150 - 200) vereinigt und die tRNA zurückgewonnen wurde. Eine analytische RPC-5-Chromatographie zeigt, daß er die untermodifizierten tRNAs^{Phe} I und II im Verhältnis 1 : 10 enthält.

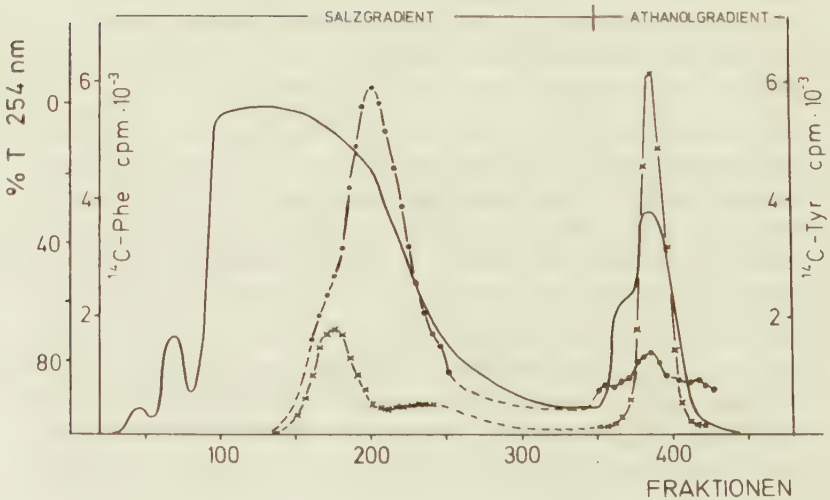
Für die Berechnung der Anreicherung muß berücksichtigt werden, daß das Ausgangsmaterial (Acceptoraktivität Phe: 45 pmol/A₂₆₀) zu etwa 25 % untermodifizierte tRNAs^{Phe} = 11,25 pmol/A₂₆₀ enthielt. Das aus den Fraktionen 150 - 200 zurückgewonnene Material hat eine Phenylalanin-Acceptorakti-

Abb. 31: Anreicherung untermodifizierter tRNA^{Phe}

Eine 3 x 90 cm BD-Cellulose wurde nach Äquilibrierung mit 0,01 M MgAc₂, 0,01 M Tris-HCl, pH 7,5, zusätzlich 0,4 M NaCl enthaltend, mit 8840 A₂₆₀ Gesamt-tRNA beladen. Die Elution erfolgte zunächst mit 3 l eines Gradienten von 0,4 M NaCl bis 1,5 M NaCl im angegebenen Puffer, anschließend wurde mit einem 2 l Gradienten von 0 bis 30 % Äthanol in 1,5 M NaCl-haltigem Puffer eluiert.

Durchfluß: 58 ml/h Fraktionen: 10 min

— T_{254 nm}
 x—x Acceptoraktivität Phe
 •—• Acceptoraktivität Tyr



vität von 110 pmol/A_{260} , womit sich ein Anreicherungsfaktor von 9,8 ergibt. Diese an untermodifizierter tRNA^{Phe} angereicherte tRNA -Fraktion wurde als Ausgangsmaterial für die KMnO_4 -Behandlung von untermodifizierter tRNA^{Phe} verwendet.

Die in der Fraktion 370 - 410 eluierte tRNA diente als angereichertes Material für die Isolierung reifer tRNA^{Phe} und von $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Tyr}}$ (Raettig et al., Publikation in Vorbereitung).

Da die beiden Tyrosin-spezifischen tRNAs an dieser Säule ebenfalls getrennt wurden, ließ sich mit dem zurückgewonnenen Material auch eine separate KMnO_4 -Behandlung der tRNA^{Tyr} -Isoacceptoren durchführen.

3.8.3. Isolierung von $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Tyr}}$

Die Isolierung von reiner $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Tyr}}$ erfolgte über drei aufeinanderfolgende Chromatographien:

- i) BD-Cellulose pH 7,5
- ii) RPC-5 pH 7,5
- iii) RPC-5 pH 4,5

Hierbei bilden die ersten beiden Chromatographien gleichfalls Reinigungsschritte für tRNA^{Phe} . Sie wurden in Zusammenarbeit mit Dr. H. H. Arnold und G. Mahal durchgeführt.

Die nach der zweiten Chromatographie erhaltene tRNA^{Tyr} -Fraktion ist noch erheblich mit tRNA^{Phe} verunreinigt. Erst nach der dritten Chromatographie (Abb. 32) läßt sich saubere $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Tyr}}$ erhalten. Die im Säuleneluat durchgeführten Acceptoraktivitätstests ergaben spezifische Aktivitäten von maximal $1570 \text{ pmol/A}_{260}$ (Fr. 44). Als reine $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Tyr}}$ -Präparation wurden die Fr. 43 - 48 gemeinsam aufgearbeitet. Hierbei wurde bewußt ein erheblicher Ausbeute-Verlust in Kauf genommen, um ein möglichst sauberes Produkt zu erhalten. Nach der Aufarbeitung wurde eine Acceptoraktivität von $1320 \text{ pmol/A}_{260}$ gemessen. Dieses entspricht unter der Annahme, daß $1700 \text{ pmol/A}_{260}$ 100 % Reinheit darstellt, einer Reinheit von mindestens 80 %. Gestützt wird diese Aussage durch das Ergebnis der

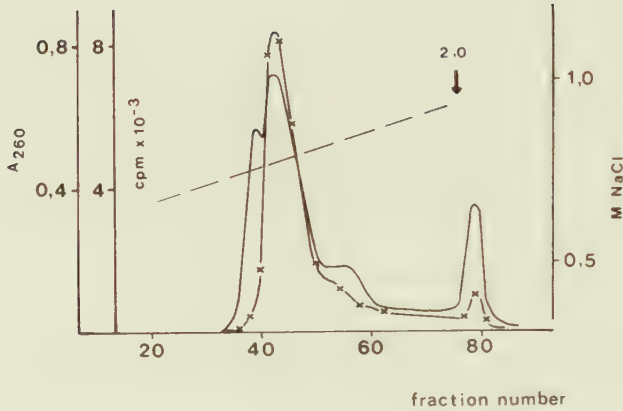


Abb. 32: Isolierung von tRNA_{II}^{Tyr}

135 A₂₆₀ einer vorgereinigten tRNA_{II}^{Tyr}-Präparation wurden an einer 1 x 93 cm RPC-5-Säule chromatographiert. Die Elution erfolgte mit 750 ml eines linearen Gradienten von Puffer C nach Puffer D.

Durchfluß: 57 ml/h Fraktionen: 9,5 ml/10 min

— A₂₆₀ x—x Acceptoraktivität Tyr

Basenanalyse, das keine Verunreinigung erkennen läßt. Im Acceptoraktivitätstest wurden Verunreinigungen durch tRNA^{Phe} (96 pmol/A₂₆₀ = 6,8 %) und durch tRNA^{Leu} (0,5 %) festgestellt.

Tab. 6 faßt die erzielten Ausbeuten und Anreicherungsfaktoren bei der Aufreinigung von tRNA^{Tyr}_{II} zusammen.

Die niedrige Ausbeute an tRNA^{Tyr}_{II} nach der Chromatographie an BD-Cellulose läßt sich teilweise damit erklären, daß tRNA^{Tyr}_I abgetrennt wurde. Dieses bedeutet einen automatischen Verlust an tyrosinacceptierender tRNA von etwa 20 %,

Tab. 6: Isolierung von tRNA^{Tyr}_{II}
Zusammenstellung der Anreicherungsfaktoren
und Ausbeuten

	A ₂₆₀	Acceptor- aktivität pmol/A ₂₆₀	Anreiche- rungsfak- tor	nmol tRNA ^{Tyr}	Aus- beute %
Gesamt-tRNA	10.200	36	1	367,2	100
BD-Cellulose/ Tyr-Pool	600	204	5,67	122,4	33,4
RPC-5/pH 7,5 Tyr-Pool	137,6	810	22,5	111,4	30,4
RPC-5/pH 4,5 Fr. 43 - 48	24,0	1.320	36,7	31,7	8,62

dem Anteil von tRNA^{Tyr}_I an der Gesamtpopulation tyrosinacceptierender tRNA.

Der zweite Reinigungsschritt erlaubt bei einem Anreicherungsfaktor von etwa 4 eine Ausbeute von 91 %.

Die geringe Ausbeute (28,5 %) im dritten Reinigungsschritt erklärt sich zum Teil aus der gewünschten hohen Reinheit des

Produkts. Die erste Hälfte des tyrosinacceptierenden Gipfels wurde wegen Verunreinigung mit tRNA^{Phe} getrennt aufgearbeitet. Aus ihr läßt sich durch eine erneute Chromatographie an RPC-5 weitere reine $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Tyr}}$ isolieren.

Ein weiterer Ausbeuteverlust tritt dadurch auf, daß entweder bei der Aufarbeitung zwischen der zweiten und der dritten Chromatographie oder während der dritten Chromatographie ein Teil von $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Tyr}}$ aggregiert und erst mit 2 M NaCl abgelöst werden kann (Fr. 77 - 85, Abb. 32). Daß es sich bei diesem Material um Aggregate Tyrosin-spezifischer tRNA handelt, wird aus folgenden experimentellen Beobachtungen geschlossen:

- i) die Elutionsposition im RPC-5-Chromatogramm macht deutlich, daß dieses Material höhermolekular als tRNA ist;
- ii) die Nucleosidanalyse nach Randerath zeigt dieselbe Zusammensetzung in Haupt- und modifizierten Basen wie $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Tyr}}$;
- iii) die Chromatographie dieses Materials an Sephadex G-200 zeigt neben niedermolekularem Material (Zersetzung bei der Aufarbeitung?) und tRNA (Dissoziation von Aggregaten während der Aufarbeitung?) deutlich höhermolekulare Anteile, die etwa 30 % der eluierten RNA ausmachen;
- iv) das Erhitzen dieser Probe auf 70°C für 10 min und anschließendes Abkühlen in Eiswasser - Bedingungen, unter denen tRNA-Aggregate dissoziieren (vgl. 3.6.1.) - bewirkt eine erheblich raschere Aminoacylierung als die einer nicht erhitzten Probe.

Das Ergebnis der Chromatographie an Sephadex G-200 macht wahrscheinlich, daß neben Dimeren zu einem geringen Anteil auch höhermolekulare Aggregate vorhanden sind. Der Mechanismus der Aggregatbildung kann erst nach Kenntnis der Sequenz

von $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Tyr}}$ diskutiert werden. Auffallend ist jedoch, daß die Aggregate im Gegensatz zu $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Tyr}}$ keine Absorptionsbande bei 335 nm und somit kein 4-Thiouridin besitzen. Diese Beobachtung macht eine Beteiligung von s^4U an der Aggregatbildung wahrscheinlich.

3.9. Zusammensetzung von $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Tyr}}$

Die Analysen der Zusammensetzung von $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Tyr}}$ wurden von Herrn Dipl.-Biol. W. Schmidt im Rahmen seiner Dissertationsarbeit durchgeführt. Hierbei wurden folgende seltenen Nucleoside gefunden: 5-Methyluridin, Pseudouridin, Dihydrouridin, 1-Methyladenosin und ein nicht identifiziertes Nucleosid.

Aus folgenden Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wird zusätzlich auf die Anwesenheit von 2-Methylthio- N^6 -isopentenyladenosin geschlossen:

- i) $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Tyr}}$ wird so stark an BD-Cellulose gebunden, daß der Zusatz von Äthanol zum Eluens zur Ablösung dieser tRNA notwendig ist; dies spricht für die Anwesenheit einer stark hydrophoben Gruppierung;
- ii) die Ergebnisse der Permanganat-Oxidation machen die Anwesenheit einer Isopentenylgruppe wahrscheinlich (vgl. 3.7.).

Weiterhin wurde spektralphotometrisch der Gehalt an 4-Thiouridin (s^4U) gemessen. Der Wert beträgt 0,78 Mol s^4U pro Mol $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Tyr}}$. Da bekannt ist, daß s^4U während der Säulenchromatographien teilweise zersetzt wird, darf ein Wert von 1 Mol s^4U pro Mol $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Tyr}}$ angenommen werden.

3.10. Charakterisierung spezifischer tRNAs
durch ihr Schmelzverhalten

Transfer-RNAs liegen in Lösung nicht als offene Polynucleotidkette, sondern als Moleküle mit ausgeprägten Sekundär- und Tertiärstrukturelementen vor. Das Kleeblattmodell wird als ein den tatsächlichen Verhältnissen sehr nahe kommendes Sekundärstrukturmodell weitgehend akzeptiert (Zachau, 1969). Es enthält Bereiche mit kompletter Basenpaarung - sogenannte Stammbereiche - und offenkettige Bereiche, die Schleifen. Die Tertiärstruktur von tRNAs, die durch Röntgenstrukturanalysen aufgeklärt wurde (Arbeitsgruppe Rich: Robertus et al., 1974; Arbeitsgruppe Klug: Suddath et al., 1974), wird durch zusätzliche Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Stamm- und Schleifenbereichen ausgebildet.

Der Anteil an Sekundär- und Tertiärstrukturelementen einer tRNA in wässriger Lösung ist - neben der Sequenz - von der Kationenkonzentration und der Temperatur abhängig. Eine Erniedrigung der Kationenkonzentration oder eine Erhöhung der Temperatur bewirken einen geringeren Anteil an Sekundär- und/oder Tertiärstruktur. Hiermit verbunden ist eine Erhöhung der UV-Absorption, da ein offenkettiges Polynucleotid gegenüber einem Polynucleotid mit geordneten Strukturen hyperchrom ist. Damit werden Strukturänderungen einer Nucleinsäure, die durch Änderung der Kationenkonzentration oder der Temperatur hervorgerufen werden, meßbar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für drei spezifische tRNAs von *B. subtilis*, tRNA_f^{Met}, tRNA_{IV}^{Phe} und tRNA_{II}^{Tyr}, die Abhängigkeit der UV-Absorption von der Temperatur, das Schmelzverhalten, untersucht. Die tRNAs waren dabei in wässrigen Cacodylat-/Phosphatpuffern mit einer Natriumionenkonzentration von 0,117 M gelöst. Unter diesen Bedingungen sollen nach Untersuchungen von Cole, Yang und Crothers (1972) tRNAs

in einer "nativen" Konformation, die alle Tertiärstrukturelemente enthält, vorliegen.

Weiterhin wurden Schmelzkurven der tRNAs in demselben Puffer, jedoch zusätzlich 0,01 M Magnesiumionen enthaltend, gemessen. Von diesen ionischen Bedingungen wird berichtet, daß sie eine deutliche Stabilisierung der Tertiärstruktur bewirkten (Cole et al., 1972).

Die Aufheizrate betrug in allen Experimenten $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Diese Heizgeschwindigkeit ist langsam genug, um Verzerrungen der Schmelzkurve durch langsame kinetische Effekte auszuschließen.

Eine Korrektur der Extinktionsmeßwerte für die Hyperchromizität des im Puffer enthaltenen EDTA brauchte nicht durchgeführt zu werden, da immer gegen einen gleichfalls erhitzten Pufferleerwert gemessen wurde.

Die tRNA-Konzentration lag bei 20°C zwischen 0,9 und $1,25 A_{260}/\text{ml}$, die angegebenen Schmelzkurven sind jedoch so normiert worden, daß sich für alle eine Absorption von 1,0 bei der Endtemperatur ergab.

Zur Verdeutlichung der einzelnen Übergänge und zur genaueren Bestimmung der Schmelzpunkte wurden aus jeder Schmelzkurve differentielle Schmelzkurven ($\Delta A_{260}/2^{\circ}\text{C}$ gegen T) angefertigt (Römer et al., 1970). Die hierin beobachteten Maxima sind identisch mit den Wendepunkten der gewöhnlichen Schmelzkurve.

3.10.1. Das Schmelzverhalten von $\text{tRNA}_{\text{f}}^{\text{Met}}$ (B. subtilis)

Die Acceptoraktivität der untersuchten Probe von $\text{tRNA}_{\text{f}}^{\text{Met}}$ lag bei $1160 \text{ pmol}/A_{260}$, sie enthielt einen geringen Anteil von tRNA^{Gly} ($154 \text{ pmol}/A_{260}$).

Die in Abb. 33 A dargestellte Schmelzkurve, die in Abwesenheit von Magnesiumionen gemessen wurde, zeigt einen steilen Anstieg der Absorption ab 54° . Der Wendepunkt der Schmelzkurve - ermittelt aus der differentiellen Schmelzkurve,

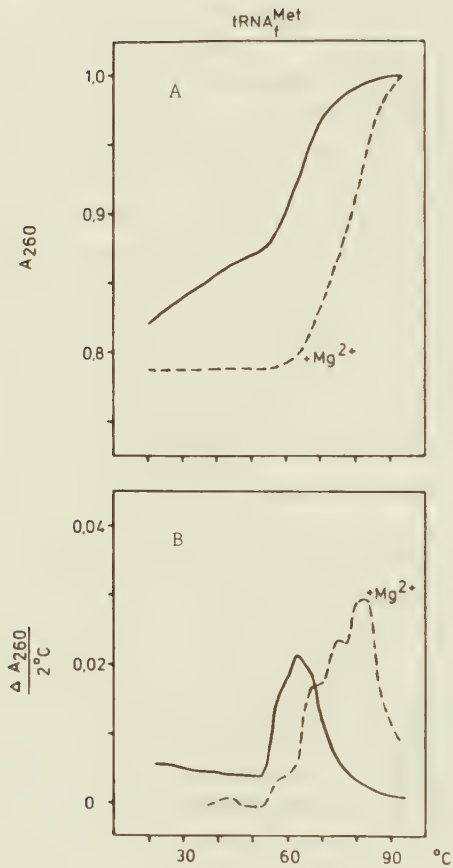


Abb. 33: Schmelzkurve von $tRNA_{f}^{Met}$ in Abwesenheit (—) und in Anwesenheit (---) von Magnesiumionen.

oben: integrale Schmelzkurve

unten: differentielle Schmelzkurve

Abb. 33 B - liegt bei 63° . Zwischen 20 und 54° ist nur ein konstanter Anstieg der Absorption zu beobachten. Diese Form ist untypisch für das Schmelzverhalten einer spezifischen tRNA. Möglicherweise werden in diesem Temperaturbereich Absorptionsänderungen der $\text{tRNA}_{\text{f}}^{\text{Met}}$ durch Absorptionsänderungen der tRNA^{Gly} -Verunreinigung oder eventuell vorhandener Abbauprodukte verdeckt.

Die in Gegenwart von Magnesiumionen gemessene Schmelzkurve zeigt drei Konformationsübergänge mit Schmelztemperaturen von 68° , 75° und 82° .

Die Zuordnung experimentell bestimmbarer Konformationsübergänge zum Aufbrechen der Tertiärstruktur bzw. zum Schmelzen einzelner Stammbereiche kann nur mit Kenntnis der Sequenz erfolgen. Zusätzlich sind Messungen des Schmelzverhaltens bei 280 nm und die Bildung des Verhältnisses $\Delta A_{260} / \Delta A_{280}$ notwendig.

Die Sequenz von $\text{tRNA}_{\text{f}}^{\text{Met}}$ ist bekannt (Yamada und Ishikura, 1975), von der Aufnahme einer Schmelzkurve bei 280 nm wurde jedoch abgesehen, da die bekannte Verunreinigung an tRNA^{Gly} eine eindeutige Interpretation nicht erlaubt hätte.

3.10.2. Das Schmelzverhalten von tRNA^{Phe} (B. subtilis)

Bei der analysierten tRNA^{Phe} -Probe handelt es sich um den zuletzt von RPC-5-Säulen eluierbaren Isoacceptor, der in dieser Arbeit als $\text{tRNA}_{\text{IV}}^{\text{Phe}}$ bezeichnet wurde. Die Acceptoraktivität der Probe lag bei $1260\text{ pmol}/A_{260}$, die Kontamination mit tRNA^{Leu} und mit tRNA^{Tyr} war vernachlässigbar.

Die in Abwesenheit von Magnesiumionen gemessene Schmelzkurve von tRNA^{Phe} (Abb. 34 B) zeigt zwei deutliche Konformationsübergänge, die Schmelztemperaturen liegen bei 28° und bei 65° (vgl. Abb. 34 B). In Anlehnung an Hinweise von Cole et al. (1972) wird der bei niedriger Temperatur zu beobachtende Übergang als Schmelzen der Tertiärstruktur inter-

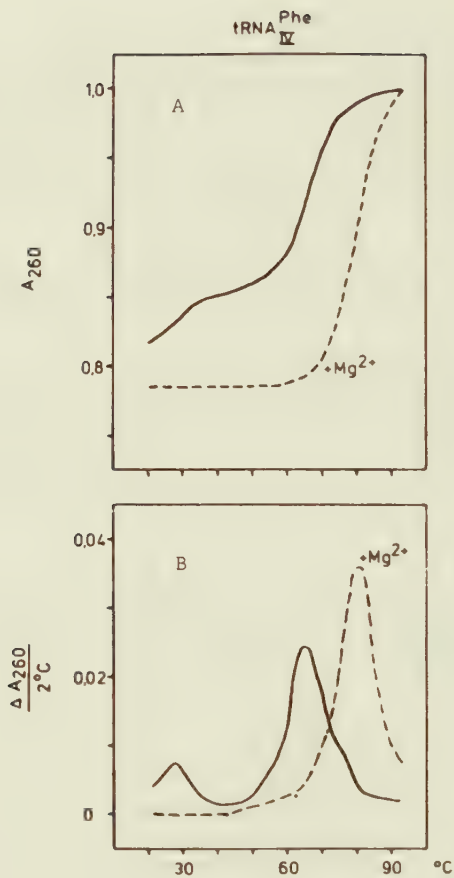


Abb. 34: Schmelzkurve von tRNA^{Phe} in Abwesenheit (—) und in Anwesenheit (---) von Magnesiumionen.

oben: integrale Schmelzkurve

unten: differentielle Schmelzkurve

pretiert, der Übergang mit $T_m = 65^\circ$ sollte dann das Aufschmelzen der einzelnen Kleeblatt-Stämme anzeigen.

In Gegenwart von Magnesiumionen ist - in Übereinstimmung mit Messungen, die Cole et al. an tRNA^{Phe} aus *E. coli* vorgenommen haben - nur ein Übergang zu beobachten.

Da die Sequenz von tRNA^{Phe} aus *B. subtilis* noch nicht bekannt ist, kann eine weitergehende Interpretation vorläufig noch nicht vorgenommen werden.

3.10.3. Das Schmelzverhalten von $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Tyr}}$ (*B. subtilis*)

Die Probe von $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Tyr}}$ akzeptierte 1320 pmol Tyr/ A_{260} . Sie war frei von tRNA^{Ser} , nur vernachlässigbar kontaminiert mit tRNA^{Leu} , enthielt jedoch zu 6,8 % tRNA^{Phe} .

Die Interpretation der in Abwesenheit sowie in Gegenwart von Magnesiumionen gemessenen Schmelzkurven (Abb. 35) wird dadurch erschwert, daß tRNA^{Tyr} Aggregate bilden kann (vgl. 3.6.1. sowie 3.8.3.). Die Dimerisierung von tRNA^{Tyr} aus *E. coli* ist mit deutlichen Absorptionsänderungen verbunden (Yang, Söll und Crothers, 1972).

Somit ist bei den zu beobachtenden Absorptionsänderungen ungeklärt, ob es sich um Konformationsänderungen des Monomeren oder um optische Effekte durch Aggregatbildung bzw. Aggregatdissoziation handelt. Nur eine genauere Charakterisierung der Aggregate wird eine Unterscheidung zwischen diesen beiden Möglichkeiten erlauben.

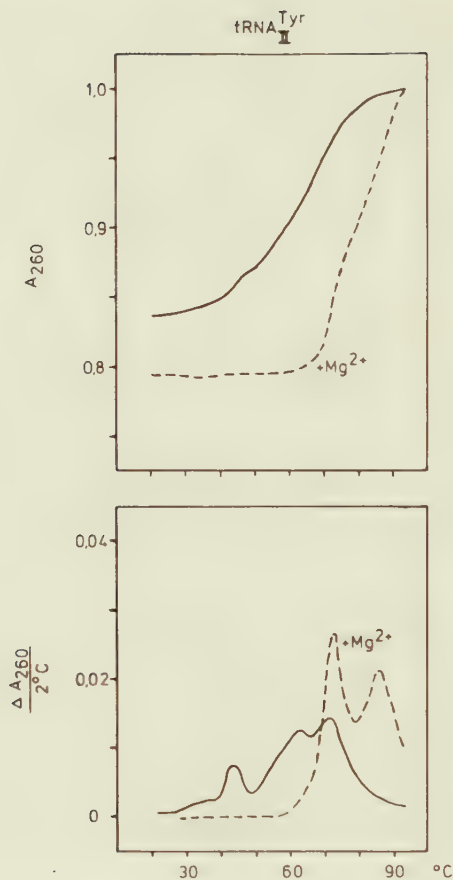


Abb. 35: Schmelzkurve von tRNA^{Tyr} in Abwesenheit (—) und in Anwesenheit (---) von Magnesiumionen.

oben: integrale Schmelzkurve

unten: differentielle Schmelzkurve

4. Diskussion

Seitdem bekannt ist, daß in zahlreichen Organismen verschiedene tRNA-Species vorkommen, die für dieselbe Aminosäure spezifisch sind, besteht die Frage, welche Funktion tRNA-Isoacceptoren haben. Diese Frage fand zunehmende Beachtung mit der Häufung von Befunden, die von Änderungen im Muster von tRNA-Isoacceptoren in Abhängigkeit von den Bedingungen des Zellwachstums berichteten (Littauer und Inouye, 1973, und darin enthaltene Literaturverweise). So wurden veränderte Muster von tRNA-Isoacceptoren nach Virusinfektion, in transformierten Zellen und in verschiedenen Differenzierungsstadien gefunden.

Das Auffinden von tRNA-Isoacceptoren ist von der Empfindlichkeit der verwendeten Analysenmethode abhängig. Frühere Untersuchungen verwendeten meist die Chromatographie an methyliertem Albumin auf Kieselgur. Die Entwicklung besserer Trennmethode wie z. B. die in dieser Arbeit angewendete RPC-5-Chromatographie, die 1971 zum ersten Mal beschrieben wurde (Pearson et al., 1971), machen jedoch eine erneute Analyse der beobachteten Veränderungen notwendig.

In der vorliegenden Arbeit wurden das Auftreten und die Verteilung von tRNA-Isoacceptoren aus *Bacillus subtilis* in Abhängigkeit von den Bedingungen des Zellwachstums untersucht. Veränderte Wachstumsbedingungen wurden durch Änderung der Zusammensetzung der Nährmedien und durch Variation der Sauerstoffversorgung erzielt. Weiterhin wurden die nach Gabe von Hemmstoffen der Proteinsynthese hervorgerufenen Veränderungen im Auftreten und Modifizierungsgrad von tRNA-Isoacceptoren analysiert.

Die Untersuchungen wurden mit Hilfe der RPC-5-Chromatographie als analytischer Methode zur Trennung und Charakterisierung von aminoacylierten tRNA-Isoacceptoren durchgeführt. Eine eindeutige Interpretation der Ergebnisse ist nur möglich,

wenn die Analysenmethode reproduzierbare Ergebnisse liefert. Deshalb soll zunächst die Methode diskutiert werden.

RPC-5-Elutionsprofile von tRNA-Isoacceptoren sind sehr gut reproduzierbar. Dies wird dadurch begünstigt, daß die Säulen nach beendeter Gradientenelution durch einfaches Umpuffern für die nächste Chromatographie vorbereitet werden können.

Viele Chromatographien, die hier dargestellt sind, wurden durch Integration der Fläche unter den Radioaktivitätspikeln quantitativ ausgewertet. Durch wiederholte Analyse derselben Probe wurde festgestellt, daß die Verteilung der Radioaktivität auf einzelne Isoacceptoren ebenfalls gut reproduzierbar war. Die Schwankungen im relativen Anteil eines Isoacceptors lagen bei 3 %, d. h. zum Beispiel, daß der relative Anteil eines Isoacceptors (Mittelwert: 70 %) zwischen 72,1 % und 67,9 % schwanken kann. Änderungen im quantitativen Verhältnis von tRNA-Isoacceptoren, die in dieser Arbeit gefunden wurden, sind damit ausschließlich auf die unterschiedlichen Bedingungen des Zellwachstums und nicht auf zufällige Artefakte während der Chromatographien an RPC-5 zurückzuführen.

Die RPC-5-Chromatographie zeichnet sich gegenüber anderen Trennmethoden weiterhin dadurch aus, daß die Menge des zu analysierenden biologischen Materials stark herabgesetzt werden kann. So waren bei vielen in dieser Arbeit durchgeführten Analysen 80 µg Gesamt-tRNA ausreichend, um auch die in geringen Mengen vorkommenden Isoacceptoren leicht aufzufinden. 80 µg Gesamt-tRNA entsprechen etwa 2 µg tRNA^{Phe} bzw. etwa 1,7 µg tRNA^{Tyr}. Durch eine weitere Herabsetzung der Säulendimensionen und des Gradientenvolumens wurde inzwischen die Empfindlichkeit um den Faktor 3 gesteigert (Raettig und Kersten, unveröffentlicht). Dabei wurde das Auflösungsvermögen nicht beeinträchtigt.

Die Anzahl der in dieser Arbeit gefundenen tRNAs aus *Bacillus subtilis* W 23 wird in Tabelle 7 mit der Anzahl der tRNAs aus anderen Organismen verglichen. Hierbei zeigt sich, daß die Multiplizität von tRNAs in *B. subtilis* derjenigen in *E. coli* und in der procaryotischen Grünalge *Anacystis nidulans* sehr ähnlich ist. In *Mycoplasma*, einem der kleinsten der zur Selbst-Replikation befähigten Organismen, sind weniger tRNA-Isoacceptoren vorhanden, in Hefe dagegen ist die Anzahl der tRNA-Isoacceptoren höher.

Es liegen noch zu wenige Vergleichsdaten vor, um eine Korrelation zwischen der Anzahl der Isoacceptoren und dem Evolutionsstand der Organismen ableiten zu können. Die Vergleiche werden besonders dadurch erschwert, daß in den Elutionsprofilen nicht zwischen unterschiedlich modifizierten isogenetischen tRNAs und heterogenetisch determinierten tRNAs unterschieden werden kann. Der Anteil an untermodifizierten tRNA-Isoacceptoren wird durch die physiologischen Bedingungen des Zellwachstums bestimmt (s. unten). Die Elutionsprofile von tRNAs aus höher entwickelten Organismen werden auch dadurch komplexer, daß neben cytoplasmatischen auch mitochondriale tRNAs auftreten.

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde untermodifizierte Phenylalanin-spezifische tRNA gefunden, wenn die Zellen bei ausreichender Sauerstoffversorgung gezüchtet wurden. Unter diesen Bedingungen fanden sich untermodifizierte tRNAs sowohl in tRNA-Präparationen aus Keimen der logarithmischen Wachstumsphase als auch in tRNA-Präparationen aus Keimen der stationären Phase. Die Gabe von Proteinsynthesehemmstoffen führte ebenfalls zu einer Anhäufung

Tabelle 7: Anzahl der tRNA-Isoacceptoren in *B. subtilis* im Vergleich mit der Anzahl der tRNA-Isoacceptoren in anderen Organismen

Aminosäure	<i>B. subtilis</i> a) W 23	<i>B. subtilis</i> b) 168 trp C2	<i>E. coli</i> B ^{c)}	<i>Anacystis</i> d) <i>nidulans</i>	<i>Mycoplasma</i> ^{e)}	Hefe ^{f)}
Ala	2	1	2	1	1	2 (4)
Arg	2	2	2		2	4
Asp	2	1	2			1
Aspn	2 (3)	2	3			3 (4)
Cys	-	-	3		1	2
Gln	-	-	2			6
Glu	2 (3)	2 (3)	2			5
Gly	3	3	3	3	1	4
His	2	2	3			2
Ile	2	3	2		2	4 (5)
Leu	5 (6)	6	5	5	3	6 (8)
Lys	3 (4)	4	2			5
Met	2	2	2	2	2	4 (5)
Phe	1 (4)	1	3	3	1	1
Pro	1 (2)	2	4			2 (6)
Ser	6	4 (5)	4	4	3	3 (4)
Thr	4	3	3			3 (6)
Trp	3	2 (3)	5			2
Tyr	2	2	2		1	2
Val	2	2	2		3	5
Summe	46 (55)	44 (47)	56			66 (81)
Summe (-Cys, -Gln)	46 (55)	44 (47)	51			58 (73)

a) diese Arbeit; b) Vold (1972, 1973a); c) Muench und Safille (1968); d) Beauchmin et al. (1973);
e) Feldmann und Falter (1971); f) Gillam et al. (1967)

von untermodifizierten Isoacceptoren der tRNA^{Phe} in *Bacillus subtilis*. Der Anteil an untermodifizierter tRNA^{Phe} war dagegen sehr gering, wenn die Zellen mit geringer Sauerstoffversorgung und entsprechend langsamer Geschwindigkeit wuchsen. Wenn die Keime in einem Maximalmedium gezüchtet wurden, war der Anteil an untermodifizierter tRNA^{Phe} ebenfalls gering.

In allen Fällen, in denen untermodifizierte Isoacceptoren der tRNA^{Phe} auftreten, ändert sich das Verhältnis der Geschwindigkeit der RNA-Synthese relativ zur Geschwindigkeit der Proteinsynthese. Hierbei könnte sich das Verhältnis der Synthese von tRNA zur Aktivität (Menge) modifizierender Enzyme ändern. Wenn die modifizierenden Enzyme einen hohen Umsatz haben und bei Substratsättigung arbeiten, dann könnte eine unvollständige Modifikation der tRNA die Folge sein. Einige experimentelle Daten, die diese Interpretation der Befunde unterstützen, sollen angeführt werden:

- i) Beim Übergang vom logarithmischen Wachstum in die stationäre Phase steigt in *B. subtilis* die RNA-Syntheserate relativ zur Proteinsyntheserate (Kersten et al., 1967). Im gleichen Zeitraum sinkt die spezifische Aktivität der Methyltransferasen in den Zellen um etwa 60 % (Mittbach, 1973).
- ii) Schnelles Wachstum von Bakterienkulturen ist verbunden mit einer Erhöhung des Verhältnisses von RNA- relativ zur Proteinsyntheserate (Skjold et al., 1973).
- iii) Unter Pactamycin-Einwirkung ergibt sich eine Erhöhung der RNA- relativ zur Proteinsyntheserate dadurch, daß bei Hemmung der Proteinsynthese um 50 bis 60 % die RNA-Syntheserate gegenüber der unbehandelten Kontrolle verdoppelt ist (Schmidt, 1973).

Unter allen genannten Bedingungen, die zu einer Anhäufung von untermodifizierten Isoacceptoren für tRNA^{Phe} führen,

ist die RNA-Syntheserate relativ zur Proteinsyntheserate erhöht. Auch bei Aminosäure-auxotrophen Mutanten mit gestörter Kontrolle der Synthese stabiler Ribonucleinsäuren (rel^- Mutanten) steigt bei Entzug der essentiellen Aminosäure die RNA-Syntheserate relativ zur Proteinsyntheserate an. In diesen Mutanten accumulieren im Aminosäuremangel tRNA-Isoacceptoren, die sich chromatographisch von denjenigen tRNAs abtrennen lassen, die in rel^+ Keimen auftreten. Fournier und Peterkofsky (1975) haben in *E.coli* CP 79 (thi^- , arg^- , his^- , thr^- , leu^- , rel^-) sowohl im Leucin- als auch im Argininmangel neue tRNA-Isoacceptoren für die Aminosäuren Arginin, Leucin, Phenylalanin und Valin nachgewiesen. Auch in *E.coli* NF 162 (arg^- , met^- , rel^-) wurden im Aminosäuremangel neue Isoacceptoren für Leucin, Phenylalanin und Valin gefunden (Chase et al., 1974). Gleiches gilt für *E.coli* K 12 PA I (arg^- , thi^- , rel^-) im Argininmangel (Schellberger, 1974).

Obwohl sich beim Wachstum von *B.subtilis* in Maximalmedium die schnellste Wachstumsgeschwindigkeit einstellt, ist der relative Anteil der untermodifizierten tRNA^{Phe}-Isoacceptoren sehr gering. Die untersuchte tRNA wurde aus Keimen der logarithmischen Wachstumsphase isoliert. Während der logarithmischen Wachstumsphase ist die Aktivität der Methyltransferasen besonders hoch, darüber hinaus wurde beobachtet, daß die Methyltransferaseaktivitäten in Keimen aus Maximalmedium höher waren als in aus in Minimalmedium gewachsenen Keimen (Mittbach, 1973; Kersten und Kersten, 1974).

Waters (1969) und Waters et al. (1973) fanden, daß in *E.coli* bei Hemmung der Proteinsynthese tRNA accu muliert, die eine Vielzahl von neuen tRNA-Isoacceptoren aufweist. Von dieser tRNA ist außerdem bekannt, daß sie weniger Modifizierungen von Uridin zu Dihydrouridin und 4-Thiouridin enthält, während zahlreiche Basenmethylierungen nicht betroffen sind. Von den unter Chloramphenicol gebildeten tRNA^{Phe}-Isoacceptoren konnte gezeigt werden, daß sie untermodifizierte Formen der

reifen tRNA^{Phe} darstellen (Mann und Huang, 1973; Juarez et al., 1975). Durch vergleichende Sequenzierung wurde gefunden, daß den untermodifizierten Formen Dihydrouridin, Pseudouridin und die Modifizierungen zum 2-Methylthio-N⁶-isopentenyladenosin fehlen (Huang und Mann, 1974).

Welche Modifizierungen fehlen den in dieser Arbeit beschriebenen untermodifizierten tRNAs^{Phe} aus *B. subtilis*? Von der reifen tRNA^{Phe} (tRNA^{Phe}_{IV}) ist bekannt (Raettig et al., Publikation in Vorbereitung), daß sie sechs verschiedene modifizierte Nucleoside enthält: Pseudouridin (Ψ), Dihydrouridin (DhU), 5-Methyluridin (T), 2'-O-Methylguanosin (Gm), 7-Methylguanosin (m⁷G) und 2-Methylthio-N⁶-isopentenyladenosin (ms^{2,6}i⁶A).

Es darf angenommen werden, daß die Methylierung in T, Gm und m⁷G auch in den untermodifizierten tRNAs^{Phe} (tRNA^{Phe}_I und tRNA^{Phe}_{II}) vorhanden sind, da tRNAs, die einen relativ hohen Anteil der untermodifizierten Isoacceptoren enthalten, weder durch homologe Methyltransferasen noch durch heterologe Methyltransferasen aus *E. coli* in einem zellfreien System mit [¹⁴C]CH₃-SAM als Methylgruppendonator nachmethyliert werden.

Über den Anteil an Dihydrouridin und Pseudouridin in den untermodifizierten tRNAs können im Rahmen dieser Arbeit keine Aussagen gemacht werden, da die Nachweismethoden für diese Nucleoside die Isolierung der untermodifizierten tRNAs voraussetzen. In untermodifizierten tRNAs^{Phe} aus *E. coli* sind DhU und Ψ nicht in vollem Ausmaß vorhanden (Huang und Mann, 1974).

Über den Grad der Modifizierung des Adenosinrests neben dem 3'-OH-Ende des Anticodons von tRNA^{Phe} zu Isopentenyladenosin (i⁶A) bzw. 2-Methylthio-N⁶-isopentenyladenosin (ms^{2,6}i⁶A) können nach den Ergebnissen der Permanganatbehandlung folgende Aussagen gemacht werden:

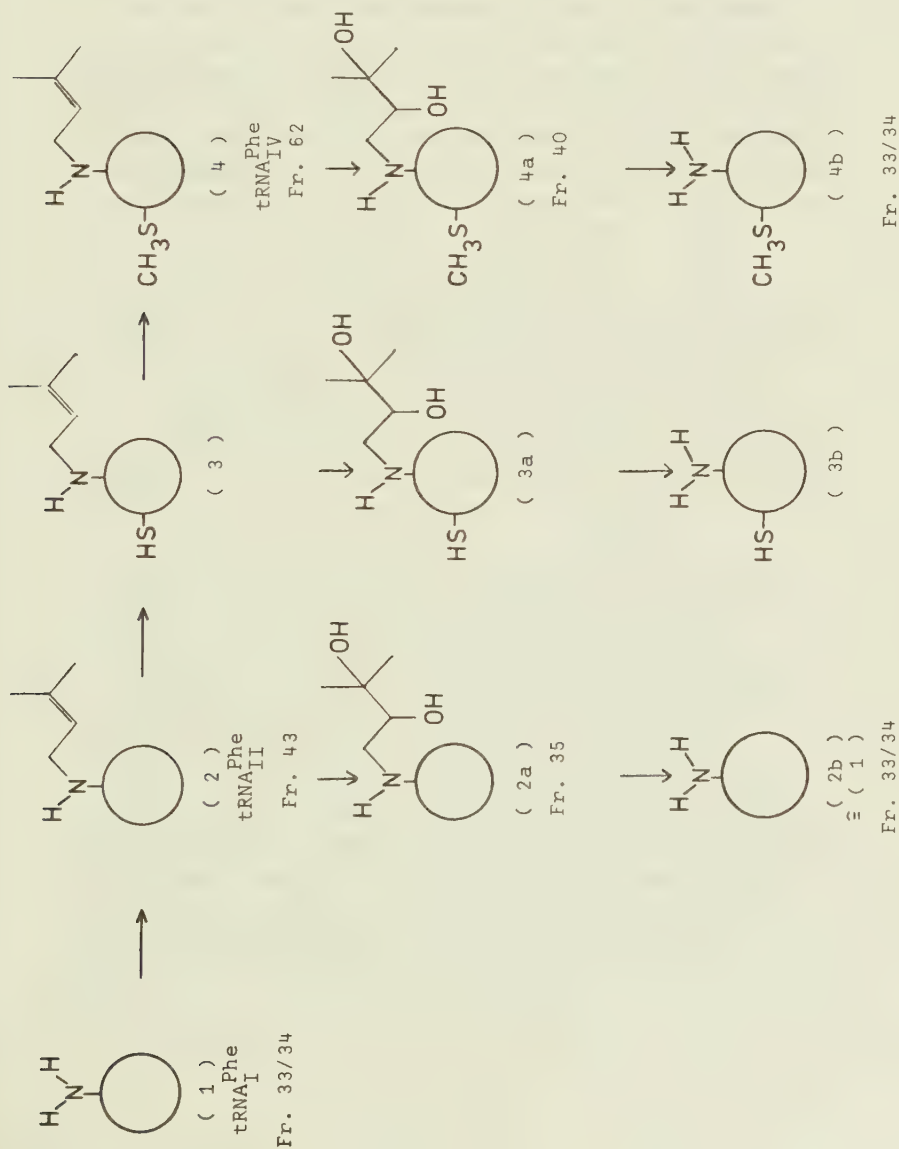
$\text{tRNA}_{\text{IV}}^{\text{Phe}}$ und $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Phe}}$ reagieren mit Permanganat und tragen daher eine Isopentenylgruppe. $\text{tRNA}_{\text{I}}^{\text{Phe}}$ konnte nicht separat untersucht werden, eine Abschätzung der Mengenverhältnisse nach KMnO_4 -Umsetzung der $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Phe}}$ -Probe, die zu einem geringen Anteil auch $\text{tRNA}_{\text{I}}^{\text{Phe}}$ enthielt, läßt vermuten, daß $\text{tRNA}_{\text{I}}^{\text{Phe}}$ nicht mit Permanganat reagiert hat.

Mit diesen Ergebnissen wird vorgeschlagen, daß der Biosyntheseweg des seltenen Nucleosids $\text{ms}^2\text{i}^6\text{A}$ in *B. subtilis* tRNA^{Phe} und damit auch der Biosyntheseweg der reifen tRNA^{Phe} analog den indirekten Befunden an *E. coli* tRNA^{Phe} (Schäfer und Söll, 1974) gemäß dem auf der nächsten Seite abgebildeten Schema abläuft [(1)→(2)→(3)→(4)].

Im Schema sind gleichfalls die Reaktionsprodukte der KMnO_4 -Behandlung aufgeführt (vgl. Hall, 1971). Danach wird N^6 -Isopentenyladenosin (2), das in $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Phe}}$ vermutet wird, in N^6 -(3,4-Dihydroxy-3-methyl-butyl)adenosin (2a) und in Adenosin (2b) umgesetzt. (2b) sollte identisch sein mit der Vorstufe im Biosyntheseweg von (2), der Verbindung (1) ($\text{tRNA}_{\text{I}}^{\text{Phe}}$). Beide tRNAs sind, wie in Abb. 29 A dargestellt, chromatographisch nicht zu unterscheiden.

2-Methylthio- N^6 -isopentenyladenosin, das wahrscheinlich in $\text{tRNA}_{\text{IV}}^{\text{Phe}}$ enthalten ist, wird durch KMnO_4 zu 2-Methylthio- N^6 -(3,4-dihydroxy-3-methyl-butyl)adenosin (4a) und 2-Methylthioadenosin (4b) umgesetzt. Zunächst ist zu fordern, daß sich (4a) und (4b) chromatographisch von (2a) bzw. (2b) unterscheiden. Diese Forderung ist für (4a) und (2a) erfüllt. (4b) wird jedoch bei derselben Kochsalzkonzentration wie (2b) und (1) eluiert. Hieraus kann geschlossen werden, daß die Methylthiogruppe aus sterischen Gründen nur dann eine starke Verschiebung im Chromatogramm bewirkt, wenn an derselben Base gleichzeitig eine Isopentenylgruppe als Substituent vorhanden ist. Dies ist in (4b) nicht mehr gegeben.

Schematische Darstellung des vorgeschlagenen Biosyntheseweges von 2-Methylthio-N⁶-isopentenyladenosin in *B. subtilis* tRNA^{Phe} (obere Zeile). Darunter sind die Reaktionsprodukte nach KMnO₄-behandlung der einzelnen tRNAs angeführt. Die Fraktionsnummern beziehen sich auf die Elutionsposition an RPC-5 (Abb. 29).



In diesem Zusammenhang muß darauf hingewiesen werden, daß der hohe Anteil an $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Phe}}$ in tRNA aus Keimen der stationären Phase nicht durch eine Gleichgewichtseinstellung zwischen den Aktivitäten modifizierender Enzyme und der Aktivität eines Enzyms, das die Isopentenylgruppe abspaltet (McLennan, 1975), gebildet werden kann. Das Produkt des abspaltenden Enzyms, die im Schema als (4b) angegebene Verbindung, ist nicht mit $\text{tRNA}_{\text{II}}^{\text{Phe}}$ identisch. (4b) wird an der Position von $\text{tRNA}_{\text{I}}^{\text{Phe}}$ eluiert. Es ist denkbar, daß die leichte Erhöhung von in diesem Bereich eluierter tRNA in der stationären Phase (vgl. Abb. 20 G) nicht durch Anhäufung von $\text{tRNA}_{\text{I}}^{\text{Phe}}$, sondern durch Abspaltung des Isopentenylrests von $\text{tRNA}_{\text{IV}}^{\text{Phe}}$ zustande kommt.

Warum entstehen untermodifizierte tRNAs? Arbeiten die modifizierenden Enzyme bei Substratsättigung, so daß sie auf eine Erhöhung des Substratangebots nicht mit einer deutlichen Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit antworten können? Es wird vermutet, daß die modifizierenden Enzyme einem schnellen "turnover" unterworfen sind, daß also eine ständige Neusynthese zur Aufrechterhaltung der Aktivität notwendig ist (Waters et al., 1973; Arnold et al., 1975). Neusynthese kann in mit Inhibitoren der Proteinsynthese behandelten Keimen nur begrenzt stattfinden, dadurch kommt es zu einer Anhäufung untermodifizierter tRNA (vgl. 3.4.). Die erhöhte Methylierbarkeit von tRNA aus mit Chloramphenicol behandelten Bakterien gegenüber tRNA aus mit Pactamycin behandelten Zellen ist dadurch erklärbar, daß in der für die Chloramphenicolbehandlung gewählten methioninauxotrophen Mutante durch Methioninmangel zusätzlich ein Mangel an dem Cosubstrat SAM hervorgerufen wurde.

Durch Pactamycinbehandlung von *B. subtilis* wurde eine Gruppe von tRNAs gebildet, die sich durch besonders hohe Acceptoraktivität für Methylgruppen auszeichnet. Diese Gruppe von tRNAs, die von Isoacceptoren für Alanin, Arginin,

Histidin, Leucin, Threonin und Tryptophan gebildet wird, hat gemeinsame Strukturmerkmale, die die gemeinsame Elutionsposition im RPC-5 - Chromatogramm verursachen. Gemeinsame Strukturmerkmale sind nicht ein erhöhtes Molekulargewicht und auch nicht eine gegenüber anderen tRNAs erhöhte Defizienz an 5-Methyluracil. Die Basenanalyse nach homologer Methylierung zeigt, daß diese tRNA-Population weniger 7-Methylguanosin und weniger 1-Methyladenosin enthält als entsprechende Kontroll-tRNA. Möglicherweise fehlen den tRNAs im Bereich erhöhter Methylierbarkeit in besonderem Maße andere Modifikationen wie Pseudouridin (Ψ) oder Dihydrouridin (DhU). Der von Davis und Nierlich (1974) vorgeschlagene Weg, eine Untermodifizierung in diesen seltenen Nucleosiden durch Analogie mit 5-Fluoruracil - substituierter tRNA nachzuweisen, ist nach meiner Meinung dadurch zweifelhaft, daß mit 5-Fluoruracil nicht nur die Bildung von Ψ und DhU verhindert wird, sondern auch alle Uracile durch 5-Fluoruracil ersetzt werden. Dies allein kann zu einer Änderung der physikalischen Eigenschaften der tRNA führen, woraus ein verändertes chromatographisches Verhalten resultiert.

Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann keine eindeutige Aussage darüber gemacht werden, ob sich die beiden Tyrosin-spezifischen tRNAs durch den Modifizierungsgrad unterscheiden oder an verschiedenen Genen synthetisiert worden sind. Aus E.coli wurden zwei heterogenetische Tyrosin-spezifische tRNAs isoliert, die sich nur durch zwei Basen in Schleife 3 unterscheiden. Die Sequenz UC in tRNA_I^{Tyr} ist durch CA in tRNA_{II}^{Tyr} ersetzt (Goodman et al., 1970). Die relative Verteilung dieser beiden Isoacceptoren ist von der Wachstumsphase abhängig (Gross und Raab, 1972). Somit darf in E.coli eine differentielle Synthese der tRNA^{Tyr}-Isoacceptoren angenommen werden, die von den physiologischen Bedingungen des Zellwachstums abhängig ist.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen eindeutig, daß auch in B.subtilis eine Korrelation zwischen der rela-

tiven Verteilung der Tyrosin-spezifischen tRNAs und den Bedingungen des Zellwachstums besteht. Eine Erhöhung des Verhältnisses der RNA-Syntheserate relativ zur Proteinsyntheserate führt zu einer Erhöhung des relativen Anteils von $\text{tRNA}_I^{\text{Tyr}}$. Unter Bedingungen, bei denen untermodifizierte tRNA^{Phe} -Isoacceptoren in reife tRNA^{Phe} überführt werden, findet keine Umwandlung von $\text{tRNA}_I^{\text{Tyr}}$ in $\text{tRNA}_{II}^{\text{Tyr}}$ statt. Dieses Ergebnis läßt sich in zweifacher Weise interpretieren:

- i) $\text{tRNA}_I^{\text{Tyr}}$ und $\text{tRNA}_{II}^{\text{Tyr}}$ sind heterogenetischer Herkunft,
- o d e r
- ii) die Modifikationen, die $\text{tRNA}_I^{\text{Tyr}}$ in $\text{tRNA}_{II}^{\text{Tyr}}$ überführen, sind andere als diejenigen, die von untermodifizierten tRNA^{Phe} -Isoacceptoren zu reifer tRNA^{Phe} führen.

Eine Lösung dieser Frage wird nur durch vergleichende Sequenzierung der beiden Tyrosin-spezifischen tRNAs möglich sein. Eine Analyse der Bruttozusammensetzung wird nicht ausreichend sein, da die Unterschiede zwischen $\text{tRNA}_I^{\text{Tyr}}$ und $\text{tRNA}_{II}^{\text{Tyr}}$ unter Umständen ähnlich gering sind wie die der Tyrosin-spezifischen tRNAs aus E.coli, die sich in der Bruttozusammensetzung nur durch einen Austausch zwischen A und U unterscheiden.

Eine Grundlage für die der Sequenzierung vorausgehende Isolierung der Tyrosin-spezifischen tRNAs ist die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Reinigung von $\text{tRNA}_{II}^{\text{Tyr}}$. Die Analyse ihrer Zusammensetzung eröffnete einen weiteren interessanten Aspekt dieser tRNA. Sie ist die erste aus einem procaryotischen Organismus isolierte spezifische tRNA, die das seltene Nucleosid 1-Methyladenosin (m^1A) enthält. Diese Modifikation wurde bisher nur in spezifischen tRNAs aus Eucaryoten gefunden. Mit einer Ausnahme besetzt m^1A die Position 19 vom 3'-Ende der tRNA (vgl. Abb. 1). Die Ausnahme wird von tRNA^{Phe} aus Kaninchenleber gebildet, die außer einem m^1A an Position 19 ein weiteres m^1A im Dihydrouridinarm enthält (Keith et al., 1973). Es wird interessant sein, zu bestimmen, welche Position

m^1A in *B.subtilis* tRNAs einnimmt. Indirekte Hinweise sprechen dafür, daß diese Modifikation in *B.subtilis* tRNAs an anderer Stelle vorkommen kann. Sie gehen von der Beobachtung aus (Agris et al., 1974), daß eine m^1A -Methyltransferase aus HeLa-Zellen, die spezifisch ist für die Methylierung von A an Position 19 vom 3'-Ende (Spremulli et al., 1974), in tRNA aus *E.coli* (sie enthält kein m^1A) dieselbe Menge an Methylgruppen einführt wie in tRNA aus *B.subtilis*, die schon m^1A enthält. Hefe-tRNA, die häufig an Position 19 zu m^1A modifiziert ist, nimmt keine Methylgruppen auf. Bei einer anderen Positionsspezifität der m^1A -Methyltransferase aus *B.subtilis* sollte Hefe-tRNA durch Extrakte aus *B.subtilis* methylierbar sein. Orientierende Versuche (Raettig und Kersten, unveröffentlicht) zeigen, daß Hefe-tRNA mit S-100 Extrakt aus *B.subtilis* 0,1 Mol Methylgruppen pro Mol tRNA aufnimmt. Daß es sich nicht nur um unspezifische heterologe Methylierung handelt, wird dadurch gezeigt, daß mit *E.coli* Extrakten keine Methylgruppenübertragung erfolgt. Durch Analyse an RPC-5 ist weiterhin sichergestellt, daß mindestens fünf spezifische, jedoch nicht alle Hefe-tRNAs methyliert werden (s. Anhang 2).

Eine endgültige Aussage darüber, welche Position m^1A in *B.subtilis* tRNA einnimmt, wird nur nach Sequenzanalyse der m^1A enthaltenden spezifischen tRNAs möglich sein. Neben $tRNA_{II}^{Tyr}$ bietet sich hierfür $tRNA_{VI}^{Ser}$ an, die ebenfalls diese Modifikation trägt (Raettig, Schmidt, Arnold und Kersten, unveröffentlichte Ergebnisse).

Die in der vorliegenden Arbeit angeführten Schmelzkurven von $tRNA_f^{Met}$, $tRNA_{IV}^{Phe}$ und $tRNA_{II}^{Tyr}$ sind eine erste physikalisch-chemische Charakterisierung dieser tRNAs. Die gewonnenen Daten lassen noch keine ausführliche Interpretation zu. Lediglich für $tRNA^{Phe}$ wurde in Abwesenheit von Magnesiumionen ein Konformationsübergang gefunden, der in Analogie zu Cole et al. (1972) als Schmelzen der Tertiärstruktur gedeutet werden kann.

Die ausführliche Interpretation von Schmelzkurven hat die Kenntnis der Sequenz zur Voraussetzung. Erst dann können genaue Zuordnungen von einzelnen Konformationsübergängen zum Schmelzen bestimmter Bereiche der Sekundärstruktur vorgenommen werden. Als besonders hilfreich für die Deutung erweist sich dabei die Messung des Verhältnisses $\Delta A_{260} / 2^{\circ}\text{C}$ zu $\Delta A_{280} / 2^{\circ}\text{C}$. Dieses Verhältnis ist von der Basenzusammensetzung der schmelzenden Helix in empfindlichen Maße abhängig (Coutts, 1971). Außerdem ist es für jeden Übergang über den gesamten Temperaturbereich konstant (Riesner und Römer, 1973). Ändert sich das Verhältnis $\Delta A_{260} / \Delta A_{280}$ während eines meßbaren Konformationsübergangs, so sind hierin mehrere Einzelübergänge enthalten.

Diese Messungen sind in dieser Arbeit nicht durchgeführt worden, da die Sequenzen der untersuchten tRNAs mit Ausnahme der Sequenz von tRNA_f^{Met} (Yamada und Ishikura, 1975) noch nicht bekannt sind. Die vorliegende Probe von tRNA_f^{Met} sollte jedoch vor einer genaueren Charakterisierung von ihrer tRNA^{Gly}-Verunreinigung abgetrennt werden.

Gerade tRNA_f^{Met} aus *B. subtilis* kann ein Modell dafür abgeben, welchen Einfluß eine Modifikation auf die Struktur einer tRNA haben kann. Das Schmelzverhalten von tRNA_f^{Met} (*B. subtilis*) unterscheidet sich vom Schmelzen der entsprechenden tRNA aus *E. coli* dadurch, daß es keinen Konformationsübergang im niederen Temperaturbereich aufweist, obwohl sich beide tRNAs nur in wenigen Basen unterscheiden. Einer der wesentlichen Unterschiede ist das Fehlen von 7-Methylguanosin in Schleife 3 in *B. subtilis* tRNA_f^{Met}. Diese Modifikation kann mit Enzymextrakten aus *E. coli* eingeführt werden (Arnold, Mahal und Kersten, unveröffentlicht). Es ist zu fragen, ob das Fehlen dieser Modifikation in einem tRNA-Bereich, der stark in die Tertiärstruktur-Wechselwirkungen einbezogen ist (Sigler, 1975), zu einer kompakteren Tertiärstruktur und damit zum Ausbleiben eines Konformationsübergangs im niederen Temperaturbereich

führt. Diese Frage kann detailliert untersucht werden durch einen Vergleich der Schmelzkurven von reiner tRNA_f^{Met} aus *B.subtilis* mit den Schmelzkurven derselben tRNA, die durch Methyltransferasen aus *E.coli* in Schleife 3 ein zusätzliches m⁷G enthält.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden - ausgehend von Literaturangaben - Bedingungen erarbeitet, die eine Veresterung von Aminosäuren mit den für sie spezifischen tRNAs aus *Bacillus subtilis* durch homologe Aminoacyl-tRNA Synthetasen erlauben. Diese Versuche dienten als Grundlage für die chromatographische Charakterisierung des gesamten Musters der tRNA-Isoacceptoren aus *B.subtilis*.

Weiterhin wurden die Analysen der Verteilung von tRNA-Isoacceptoren durch Reversed-Phase Chromatographie - System 5 (RPC-5) - so weit verfeinert, daß auch mit geringen Mengen biologischen Materials eine hohe Nachweisempfindlichkeit erreicht wurde.

Die Elutionsprofile an RPC-5 der für 18 verschiedene Aminosäuren spezifischen tRNAs zeigen, daß in *B.subtilis* zumindest 46 spezifische tRNAs vorhanden sind. Unter Einbeziehung der in sehr geringen Mengen gefundenen Isoacceptoren wurden insgesamt 55 tRNAs gefunden. Die Multiplizität der tRNA-Isoacceptoren aus *B.subtilis* wird im Vergleich mit anderen Organismen und deren Stellung in der Evolution diskutiert.

Änderungen der RNA-Syntheserate relativ zur Proteinsyntheserate führten in *B.subtilis* zu definierten Änderungen im Elutionsprofil und Modifizierungsgrad von tRNA-Isoacceptoren:

- i) Die Behandlung von *B.subtilis* mit dem Proteinsynthesehemmstoff Pactamycin führte zu einer Änderung der quantitativen Verteilung der für folgende Aminosäuren spezifischen tRNAs: Alanin, Glycin, Histidin, Leucin, Phenylalanin, Serin und Tyrosin. Für Glutaminsäure wurde ein zusätzlicher Isoacceptor gefunden. Bei den für Arginin, Asparagin, Asparaginsäure, Isoleucin, Lysin, Methionin, Prolin, Threonin, Tryptophan und Valin spezifischen tRNAs wurden keine Änderungen gefunden.

- ii) Transfer-RNAs aus mit Pactamycin behandeltem *B. subtilis* können in vitro methyliert werden. Durch Analyse der Verteilung der methylierten Produkte im Elutionsprofil einer RPC-5 - Chromatographie wurde ein Bereich erhöhter Acceptoraktivität für Methylgruppen gefunden. Er umfaßt tRNA-Isoacceptoren für Alanin, Arginin, Histidin, Leucin, Threonin und Tryptophan. Der Bereich erhöhter Acceptoraktivität für Methylgruppen wurde durch Größenbestimmung, Analyse der eingeführten methylierten Basen und Untersuchungen über die Defizienz an 5-Methyluracil charakterisiert.
- iii) Bei Änderung der Sauerstoffversorgung einer wachsenden *B. subtilis* Kultur entstehen tRNA-Populationen, die sich nach RPC-5 - Chromatographie im Muster der Phenylalanin-, Serin- und Tyrosinspezifischen tRNA-Isoacceptoren unterscheiden. Die Verteilung dieser tRNA-Isoacceptoren ist außerdem von der Zusammensetzung des Nährmediums abhängig.

Eine Analyse des Musters der tRNA^{Phe}-Isoacceptoren in Abhängigkeit von der Wachstumsphase und unter Bedingungen der RNA-Synthesehemmung zeigt, daß die früh eluierten tRNA^{Phe}-Isoacceptoren untermodifizierte Formen der reifen tRNA^{Phe} sind. Die untermodifizierten tRNA^{Phe}-Isoacceptoren treten immer dann auf, wenn in *B. subtilis* das Verhältnis der RNA-Syntheserate relativ zur Proteinsyntheserate erhöht ist. Indirekte Ergebnisse zeigen, daß sich die untermodifizierten tRNA^{Phe}-Isoacceptoren von der reifen tRNA^{Phe} durch den Modifizierungsgrad des Nucleosids 2-Methylthio-N⁶-isopentenyladenosin unterscheiden. Hieraus wird ein Biosyntheseweg der reifen tRNA^{Phe} vorgeschlagen und im Zusammenhang mit der Biosynthese von tRNA^{Phe} aus *E. coli* diskutiert.

Die Verteilung der tRNA^{Tyr}-Isoacceptoren wurde in gleicher Weise in Abhängigkeit von Wachstumsphase und Wachstumsge-

schwindigkeit untersucht. Die Ergebnisse lassen keine eindeutige Aussage darüber zu, ob es sich um heterogenetische oder um unterschiedlich modifizierte isogenetische tRNAs handelt. Eine derartige Aussage wird nur durch Sequenzanalyse möglich sein. Als Grundlage hierfür ist die Reinigung von tRNA_{II}^{Tyr} beschrieben.

Drei spezifische tRNAs aus *B.subtilis*, tRNA_f^{Met}, tRNA_{IV}^{Phe} und tRNA_{II}^{Tyr}, wurden durch ihr Schmelzverhalten charakterisiert. Aus dem Vergleich der Schmelzkurven von tRNA_f^{Met} (*E.coli*) und tRNA_f^{Met} (*B.subtilis*) ergeben sich Hinweise auf die mögliche Einbeziehung des seltenen Nucleosids 7-Methylguanosin in die Tertiärstruktur-Wechselwirkungen.

Literaturverzeichnis

- Agris, P. F., L. L. Spemulli und G. M. Brown (1974)
Arch. Biochem. Biophys. 162, 38 - 47
- Arceneaux, J. L., und N. Sueoka (1969)
J. Biol. Chem. 244, 5959 - 5966
- Arnold, H. H. (1973)
Dissertation Universität Erlangen-Nürnberg
- Arnold, H. H., und H. Kersten (1973)
FEBS Letters 36, 34 - 38
- Arnold, H. H., W. Schmidt und H. Kersten (1975a)
FEBS Letters 52, 62 - 65
- Arnold, H. H., W. Schmidt, R. Raettig, L. Sandig,
H. Domdey und H. Kersten (1975b)
Arch. Biochem. Biophys., zur Veröffentlichung einge-
reicht
- Avital, S., und D. Elson (1969)
Biochim. Biophys. Acta 179, 297 - 307
- Bailey, J. L. (1967)
in Techniques in Protein Chemistry, Elsevier,
Amsterdam, S. 342
- Barrell, G., J. G. Seidmann, C. Guthrie und W. H.
McClain (1974)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 413 - 416
- Beauchemin, N., B. Larue und R. J. Cedergren (1973)
Arch. Biochem. Biophys. 156, 17 - 25
- Björk, G. R., und L. A. Isaksson (1970)
J. Mol. Biol. 51, 83 - 100
- Both, G. W., A. K. Banerjee und A. J. Shatkin (1975)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 1189-1193
- Bray, G. A. (1960)
Anal. Biochem. 1, 279 - 285
- Brenner, M., J. A. Lewis, D. S. Straus, F. DeLorenzo
und B. N. Ames (1972)
J. Biol. Chem. 247, 4333 - 4339
- Buckingham, R. A., A. Danchin und M. Grunberg-Manago
(1973)
Biochemistry 12, 5393 - 5399

- Cedergren, R. J., J. R. Cordeau und P. Robillard (1972)
J. Theor. Biol. 37, 209 - 220
- Chang, G. W., J. R. Roth und B. N. Ames (1971)
J. Bacteriol. 108, 410 - 414
- Chase, R., G. M. Tener und I. C. Gillam (1974)
Arch. Biochem. Biophys. 163, 306 - 317
- Cole, P. E., S. K. Yang und D. M. Crothers (1972)
Biochemistry 11, 4358 - 4368
- Coutts, S. M. (1971)
Biochim. Biophys. Acta 232, 94 - 106
- Davis, A. R., und D. P. Nierlich (1974)
Biochim. Biophys. Acta 374, 23 - 37
- Dijk, J., und R. P. Singhal (1974)
J. Biol. Chem. 249, 645 - 648
- Doi, R. H. (1971)
in: J. A. Last und A. I. Laskin (Hrsgb.), Protein
Biosynthesis in Bacterial Systems, Marcel Dekker,
New York, S. 68 - 88
- Doi, R. H., I. Kaneko und B. Goehler (1966)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 56, 1548 - 1551
- Doi, R. H., H. L. Bishop und L. K. Migata (1969)
in: L. L. Campbell und H. O. Halvorson (Hrsgb.),
Spores IV, American Society for Microbiology,
Washington, D. C., S. 159 - 174
- Ehresmann, C., P. Stiegler, G. A. Mackie, R. A. Zimmer-
mann, J. P. Ebel und P. Fellner (1975)
Nucl. Acids Res. 2, 265- 278
- Erdmann, V. A., M. Sprinzl und O. Pongs (1973)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 54, 942 - 948
- Feldmann, H., und H. Falter (1971)
Eur. J. Biochem. 18, 573 - 581
- Fellner, P. (1969)
Eur. J. Biochem. 11, 12 - 27
- Fleissner, E., und E. Borek (1962)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48, 1199 - 1203
- Forget, B. M., und S. M. Weissmann (1967)
Science 158, 1695 - 1699
- Fornier, M. J., und A. Peterkofsky (1975)
J. Bacteriol. 122, 538 - 548

- Ghosh, K., und H. P. Ghosh (1970)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 40, 135 - 143
- Gillam, I., S. Millward, D. Blew, M. von Tigerstrom,
E. Wimmer und G. M. Tener (1967)
Biochemistry 6, 3043 - 3056
- Goehler, B., und R. H. Doi (1968)
J. Bacteriol. 95, 793 - 800
- Good, N. E., G. D. Winget, W. Winter, T. N. Conolly,
S. Izawa und R. M. M. Singh (1966)
Biochemistry 5, 467 - 477
- Goodman, H. M., J. N. Abelson, A. Landy, S. Zadrazil
und J. D. Smith (1970)
Eur. J. Biochem. 13, 461 - 483
- Gross, H. J., und C. Raab (1972)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 46, 2006 - 2011
- Hall, R. H. (1971)
The Modified Nucleosides in Nucleic Acids,
Columbia University Press, New York
- Huang, P. C., und M. B. Mann (1974)
Biochemistry 13, 4704 - 4710
- Hurwitz, I., M. Gold und M. Anders (1964)
J. Biol. Chem. 239, 3462 - 3473
- Juarez, H., A. C. Skjold und C. Hedgcoth (1975)
J. Bacteriol. 121, 44 - 54
- Kahle, P., P. Hoppe-Seyler und H. Kröger (1971)
Biochem. Biophys. Acta 240, 384 - 391
- Keith, G., F. Picaud, J. Weissenbäch, J. P. Ebel,
G. Petrissant und G. Dirheimer (1973)
FEBS Letters 31, 345 - 347
- Kersten, H. (1971)
in: F. E. Hahn (Hrsgb.), Progress in Molecular and
Subcellular Biology, Vol. 2, Springer, Berlin, Hei-
delberg, New York, S. 58 - 68
- Kersten H., und W. Kersten (1974)
in: Proc. IXth FEBS Meeting, Vol. 34, Verlag der
Ungarischen Akademie der Wissenschaften, Budapest,
S. 99 - 110
- Kersten, H., W. Kersten, B. Emmerich und P. Chandra
(1967)
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 1424 - 1430

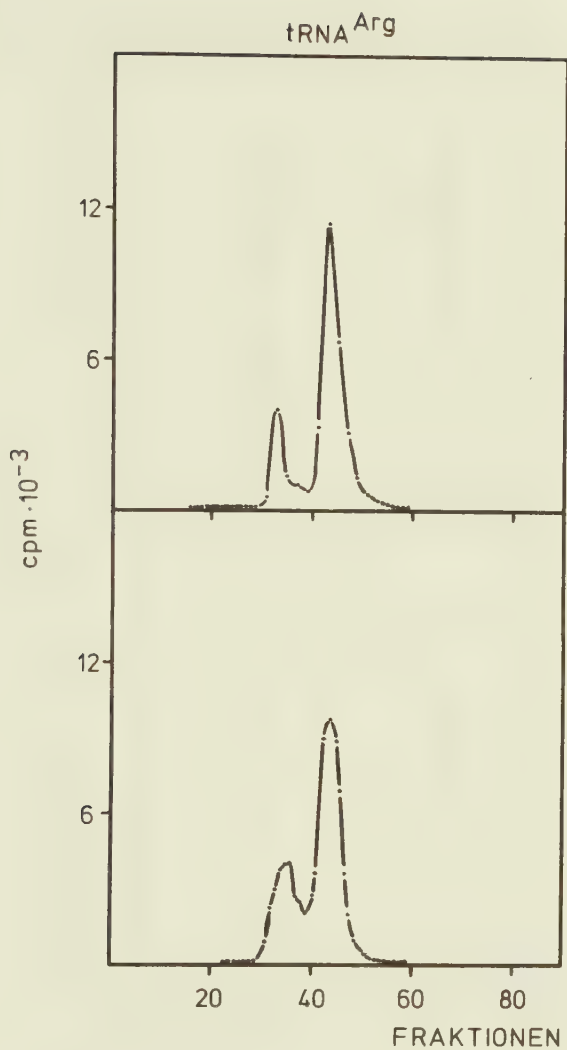
- Kersten, H., P. Chandra, W. Tanck, W. Wiedemhöver
und W. Kersten (1968)
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 659 - 663
- Kersten, H., L. Sandig und H. H. Arnold (1975)
FEBS Letters 55, 57 - 60
- Kline, L. K., F. Fittler und R. H. Hall (1969)
Biochemistry 8, 4361 - 4371
- Lazzarini, R. A., und E. Santangelo (1967)
J. Bacteriol. 94, 125 - 130
- Lipsett, M. N. (1965)
J. Biol. Chem. 240, 3975 - 3978
- Littauer, U. Z. und H. Inouye (1973)
Ann. Rev. Biochem. 42, 439 - 470
- Mann, M. B., und P. C. Huang (1973)
Biochemistry 12, 5289 - 5294
- Mans, R. J. und G. Novelli (1961)
Arch. Biochem. Biophys. 94, 48 - 53
- Marinus, M. G., N. R. Morris, D. Söll und T. C. Kwong
(1975)
J. Bacteriol. 122, 257 - 265
- McLennan, B. D. (1975)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 65, 345 - 351
- McMillian, R. A., und J. L. Arceneaux (1975)
J. Bacteriol. 122, 526 - 531
- Mittbach, J. (1973)
Diplomarbeit Universität Erlangen-Nürnberg
- Muench, K. H., und P. A. Saffille (1968)
Biochemistry 7, 2788 - 2808
- Nakada, D. (1965)
Biochim. Biophys. Acta 103, 455 - 465
- Nirenberg, M. N., und J. H. Matthaei (1961)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 47, 1588 - 1602
- Nishimura, S. (1972)
in: J. N. Davidson und W. E. Cohn (Hrsgb.) Progress in
Nucleic Acid Research and Molecular Biology, Vol. 12,
Academic Press, New York, London, S. 49 - 85

- Pearson, R. L., J. F. Weiss und A. D. Kelmers (1971)
 Biochim. Biophys. Acta 228, 770 - 774
- Phillips, J. H., und K. Kjellin-Straby (1967)
 J. Mol. Biol. 26, 509 - 518
- Raettig, R. (1973)
 Diplomarbeit Universität Erlangen-Nürnberg
- Randerath, E., C.-T. Yu und K. Randerath (1972)
 Anal. Biochem. 48, 172 - 198
- Randerath, K., E. Randerath, L.-L. S. Y. Chia und
 und B. J. Nowak (1974)
 Anal. Biochem. 59, 263 - 271
- Richter, D., V. A. Erdmann und M. Sprinzl (1973)
 Nature New Biology 246, 132 - 135
- Riesner, D., und Römer, R. (1973)
 in: J. Duchesne (Hrsgb.), Physico-Chemical Properties
 of Nucleic Acids, Academic Press, New York, S. 237
- Robertus, J. D., J. E. Ladner, J. T. Finch, D. Rhodes,
 R. S. Brown, B. F. C. Clark und A. Klug (1974)
 Nature 250, 546 - 551
- Roe, B., M. Sirover und B. Dudock (1973a)
 Biochemistry 12, 4146 - 4154
- Roe, B., M. Michael und B. Dudock (1973b)
 Nature New Biology 246, 135 - 139
- Roe, B., K. Marcu und B. Dudock (1973c)
 Biochim. Biophys. Acta 319, 25 - 36
- Römer, R., D. Riessner, S. M. Coutts und G. Maass (1970)
 Eur. J. Biochem. 15, 77 - 84
- Rubin, I. B., A. D. Kelmers und G. Goldstein (1967)
 Anal. Biochem. 20, 533 - 544
- Schaefer, K. P., S. Altman und D. Söll (1973)
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 3626 - 3630
- Schäfer, K. P., und D. Söll (1974)
 Biochimie 56, 795 - 804
- Schellberger, H. (1974)
 Dissertation Universität Erlangen-Nürnberg
- Schmidt, W. (1973)
 Diplomarbeit Universität Erlangen-Nürnberg

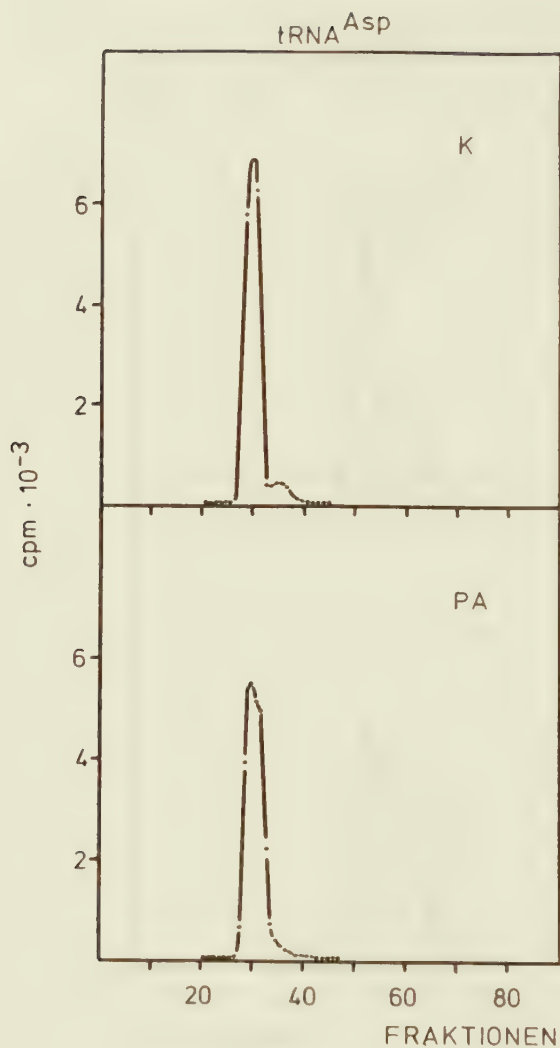
- Schmidt, W., H. H. Arnold und H. Kersten (1975)
Nucl. Acids Res. 2, 1043 - 1051
- Singer, C. E., G. R. Smith, R. Cortese und B. N. Ames
(1972)
Nature New Biology 238, 72 - 74
- Sigler, P. B. (1975)
Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 4, 477 - 528
- Skjold, A. C., H. Juarez und C. Hedgcoth (1973)
J. Bacteriol. 115, 177 - 187
- Söll, D., und U. L. RajBhandary (1967)
J. Mol. Biol. 29, 97 - 112
- Spremulli, L. L., P. F. Agris, G. M. Brown und
U. L. RajBhandary (1974)
Arch. Biochem. Biophys. 161, 22 - 37
- Suddath, F. L., G. J. Quigley, A. McPherson, D. Sneden,
J. J. Kim, S. H. Kim und A. Rich (1974)
Nature 248, 20 - 24
- Sueoka, N., und J. Hardy (1968)
Arch. Biochem. Biophys. 125, 558 - 566
- Thiebe, R., und H. G. Zachau (1968)
Eur. J. Biochem. 5, 546 - 555
- Vold, B. S. (1973a)
J. Bacteriol. 113, 825 - 833
- Vold, B. S. (1973b)
J. Bacteriol. 114, 178 - 182
- Vold, B. S., und S. Minatogawa (1972)
in: H. O. Halvorson, R. Hanson und L. L. Campbell
(Hrsgb.), Spores V, American Society for Microbiology,
Washington, D. C., S. 254 - 263
- Waters, L. C. (1969)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 37, 296 - 304
- Waters, L. C., L. Shugart, W.-K. Yang und A. N. Best (1973)
Arch. Biochem. Biophys. 156, 780 - 793
- Weeren, H. O., A. D. Ryon, D. E. Heatherly und A. D.
Kelmers (1970)
Biotechn. & Bioeng. 12, 889 - 912

- Yamada, Y., und H. Ishikura (1975)
FEBS Letters 54, 155 - 158
- Yang, S. K., D. Söll und D. M. Crothers (1972)
Biochemistry 11, 2311 - 2320
- Zachau, H. G. (1969)
Angew. Chemie 81, 645 - 662
- Zubay, G. (1962)
J. Mol. Biol. 4, 347 - 356

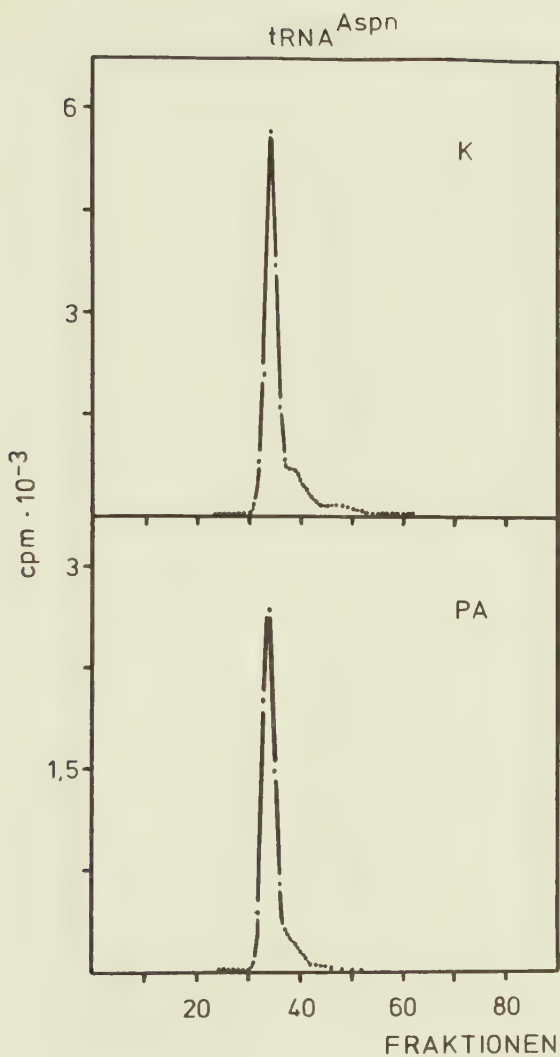
- Anhang 1: RPC-5 Elutionsprofile der tRNAs, bei denen zwischen unbehandelten Kontrollen und mit Pactamycin behandelten Keimen keine Unterschiede gefunden wurden (Abschnitt 3.3.1.1., Seite 41)
- Anhang 2: RPC-5 Elutionsprofil von Hefe-tRNA nach Methylierung mit S-100 Extrakt aus *B.subtilis* und ^{14}C -SAM (Diskussion, Seite 123)



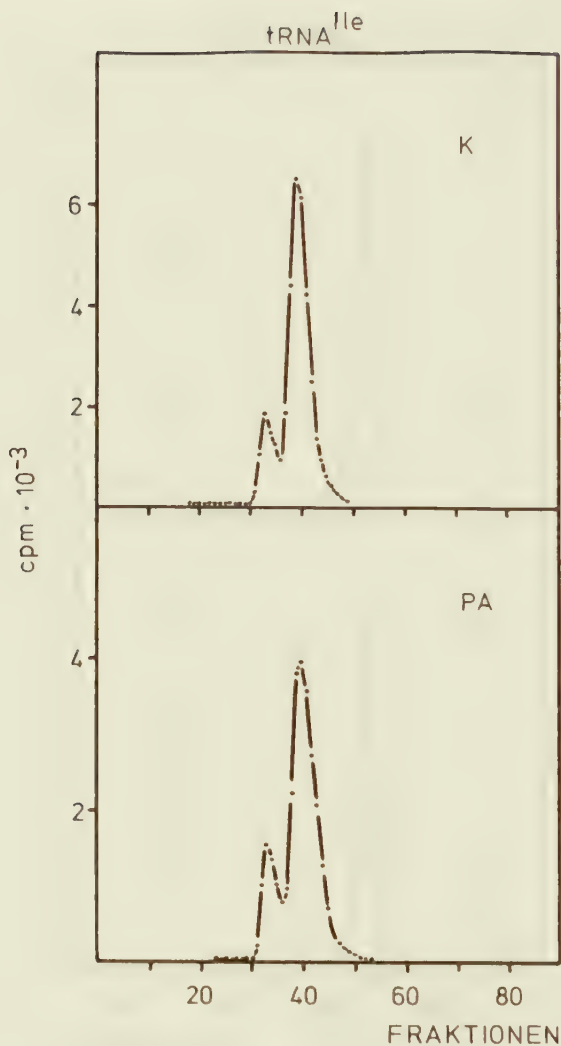
RPC-5-Elutionsprofile von ¹⁴C-Arg-tRNA^{Arg} aus Kontrollkeimen (K) und aus Pactamycin behandelten Keimen (PA). Chromatographiebedingungen: Standardsäule



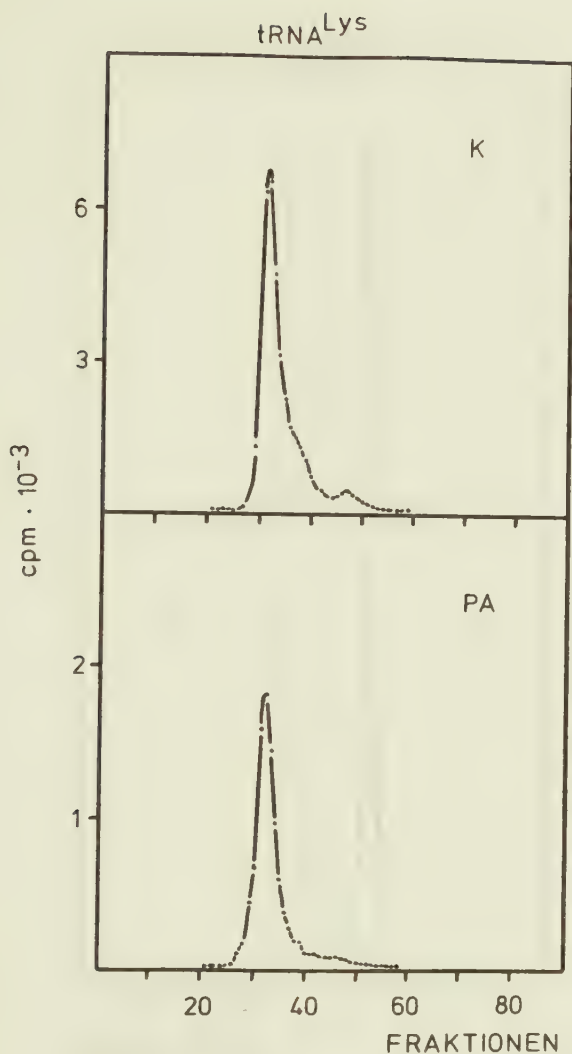
RPC-5-Elutionsprofile von 3H -Asp- $tRNA^{Asp}$ aus Kontrollkeimen (K) und aus Pactamycin behandelten Keimen (PA). Chromatographiebedingungen: Standardsäule



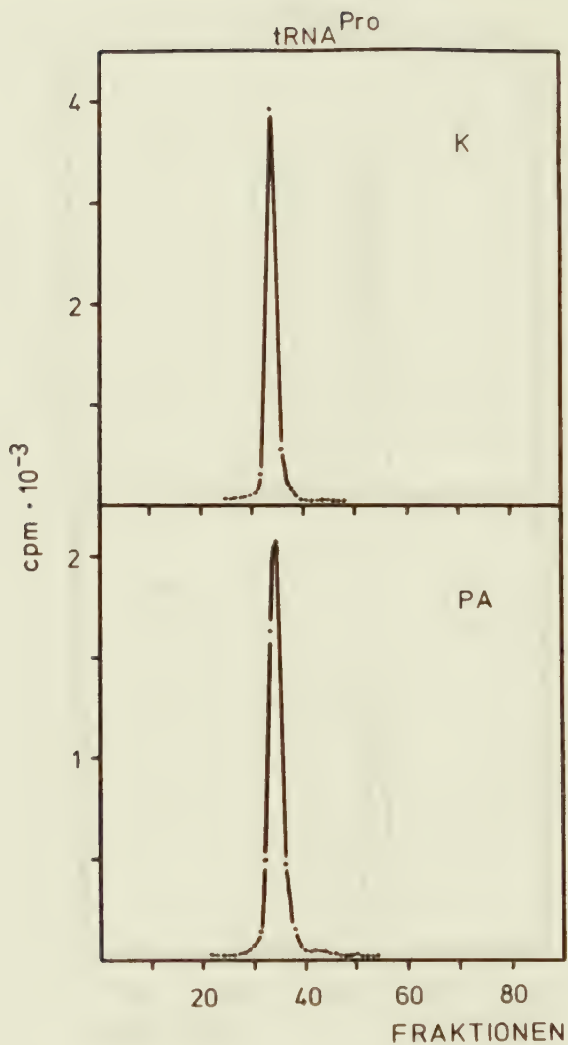
RPC-5-Elutionsprofile von ^{14}C -Asp- $tRNA^{Asp}$ aus Kontrollkeimen (K) und aus Pactamycin behandelten Keimen. Chromatographiebedingungen: Standardsäule



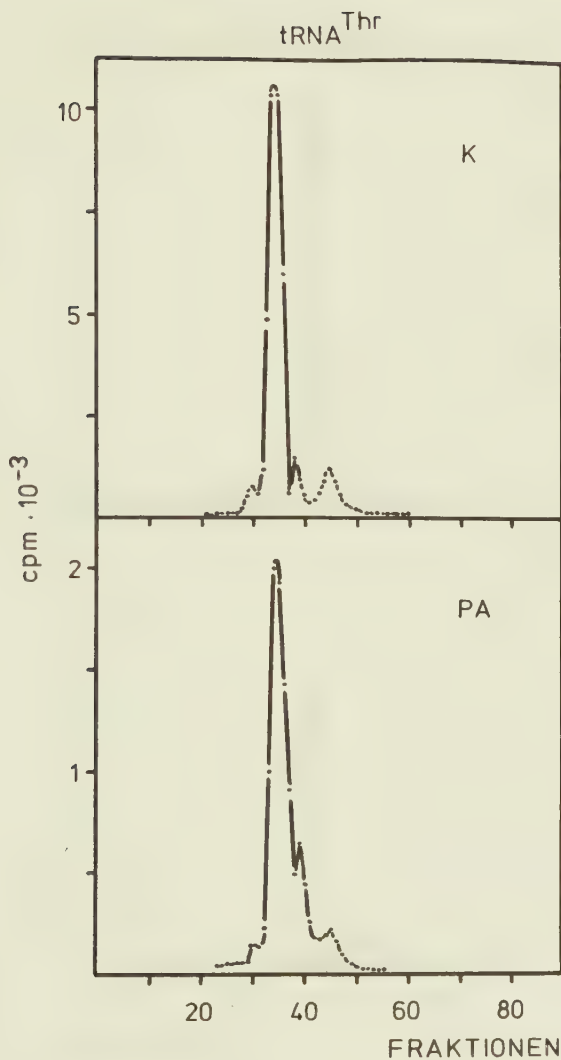
RPC-5-Elutionsprofile von ^{14}C -Ile- $tRNA^{Ile}$ aus Kontrollkeimen (K) und aus Pactamycin behandelten Keimen (PA). Chromatographiebedingungen: Standardsäule



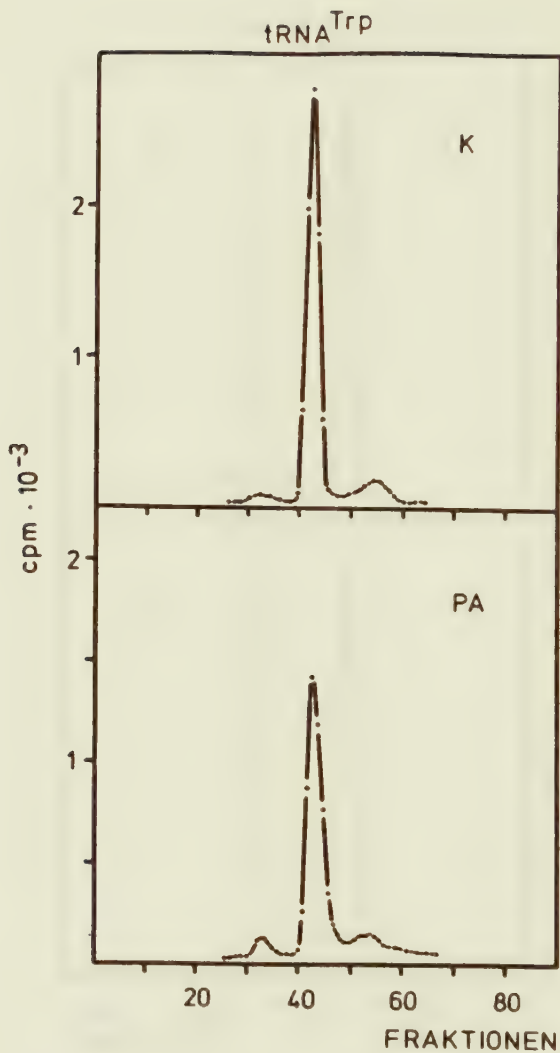
RPC-5-Elutionsprofile von ^{14}C -Lys- $tRNA^{Lys}$ aus Kontrollkeimen (K) und aus Pactamycin behandelten Keimen (PA). Chromatographiebedingungen: Standardsäule



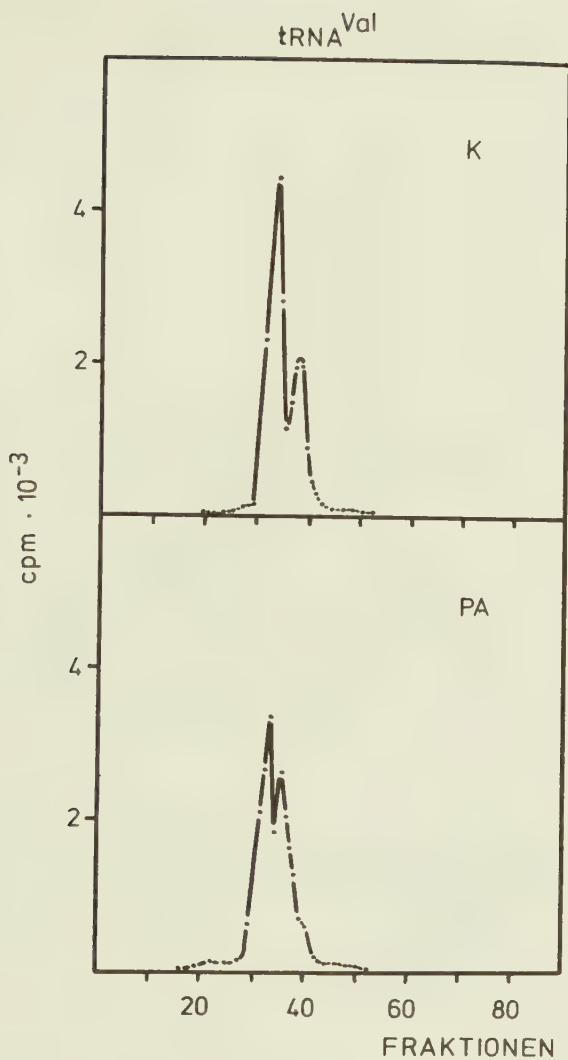
RPC-5-Elutionsprofile von ^3H -Pro-tRNA^{Pro} aus Kontrollkeimen (K) und aus Pactamycin behandelten Keimen (PA). Chromatographiebedingungen: Standardsäule



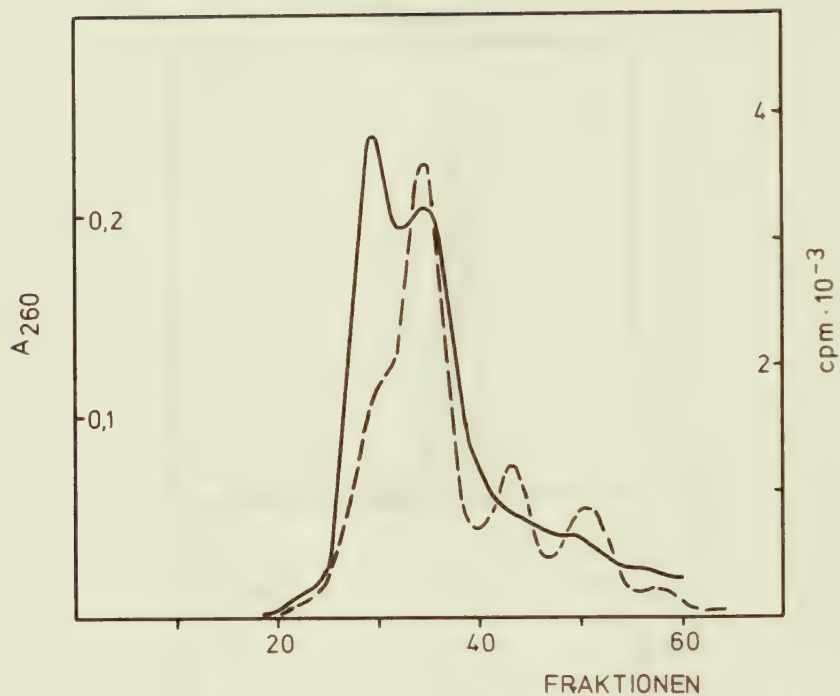
RPC-5-Elutionsprofile von ^{14}C -Thr-tRNA^{Thr} aus Kontrollkeimen (K) und aus Pactamycin behandelten Keimen (PA). Chromatographiebedingungen: Standardsäule



RPC-5 Elutionsprofile von ^{14}C -Trp-tRNAs^{Trp}
 aus Kontrollkeimen (K) und aus Pactamycin
 behandelten Keimen (PA). Chromatographie-
 bedingungen: Standardsäule



RPC-5-Elutionsprofile von ^{14}C -Val-tRNAs^{Val} aus Kontrollkeimen (K) und aus Pactamycin behandelten Keimen (PA). Chromatographiebedingungen: Standardsäule



RPC-5-Elutionsprofil von Hefe-tRNA nach Methylierung mit S-100 Extrakt aus *B.subtilis* und ^{14}C -SAM

— A_{260}

- - - $^{14}\text{C}-\text{CH}_3$

Frau Professor Dr. H. Kersten danke ich herzlich für die Anregung zu dieser Arbeit, die stets freundliche Unterstützung und die durch ständige Diskussionsbereitschaft mögliche intensive Betreuung.

Herrn Professor Dr. W. Kersten danke ich für die vielfältige Förderung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Instituts danke ich für zahlreiche Anregungen und hilfreiche Diskussionen.

Lebenslauf

Am 24.4.1947 wurde ich, Randolph Raettig, als zweiter Sohn des Rechtsanwalts Dr. Gerhard Raettig und seiner Ehefrau Sigrune, geborene Dreyhaus, in Bremen geboren.

Von 1953 bis 1957 besuchte ich die Volksschule an der Schwachhauser Heerstraße in Bremen. 1957 trat ich in das Gymnasium Am Barkhof in Bremen ein. Am neusprachlichen Zweig dieses Gymnasiums legte ich im Februar 1966 das Abitur ab.

Im Sommersemester 1966 begann ich mit dem Studium der Chemie an der Universität Erlangen-Nürnberg. Im Februar 1969 legte ich dort die Diplom-Chemiker-Vorprüfung ab. Im Mai 1972 bestand ich die Diplom-Chemiker-Hauptprüfung.

Von Juli 1972 bis April 1973 fertigte ich meine Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Biochemie unter Leitung von Frau Professor Dr. H. Kersten an.

Die vorliegende Arbeit wurde seit Mai 1973 unter der Leitung von Frau Professor Dr. H. Kersten in derselben Arbeitsgruppe erstellt.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990